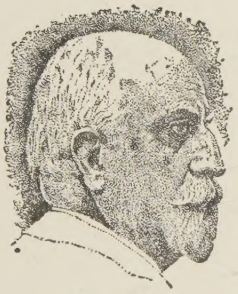
VOLUMEN 10 ABRIL-JUNIO 1957 NUM. 2

Microbiología Española

publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



RAM
MM

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Páginas

Consideraciones acerca de la valoración de la eficacia de las vacunas antitetánicas, por *Florencio Moreno de Vega* 151

Acción de los agentes químicos sobre los virus y experiencias con el antivariólico cultivado en huevos de gallina (conclusión), por *M.ª Luisa Alonso*... ... 159

Nota sobre algunas modificaciones introducidas en la tinción de núcleos de microorganismos, por *Carlos Ramírez Gómez* 201

Formación de 6-metil ácido salicílico por el *Penicillium patulum* Bainier, por *R. Lahoz* y *Domingo Rodríguez* 205

Contribución al estudio de la ecología de las levaduras. I. Estudio de levaduras aisladas de hongos carnosos, por *Carlos Ramírez Gómez* 215

Actas de la Sociedad 249

CONSIDERACIONES ACERCA DE LA VALORACION DE LA EFICACIA DE LAS VACUNAS ANTITETANICAS

POR

FLORENCIO MORENO DE VEGA

De la lectura de las comunicaciones presentadas a la Primera Reunión Europea de Estandardización Biológica, celebrada en Lyon al comienzo del verano de 1955 y entre la multiplicidad de opiniones manifestadas, respecto del toxoide tetánico, destacan ciertos puntos de vista, de un reducido número de comunicantes, que permiten al inmunólogo adquirir un criterio de utilidad. Es harto sabido que las pruebas de eficacia de las vacunas antitetánicas difieren de unos países a otros, siendo indudable que un procedimiento deseable y universal estribaría en que dispusiéramos de un *toxoide patrón* y de una *toxina patrón,* utilizables con arreglo a unas normas uniformes en cuanto a la elección de animales de experimentación (cobayo o ratón blanco), vías de administración de la vacuna, número de animales, base biológica del procedimiento (tipo Prigge, Greenberg, etc.), número y grado de las diluciones antigénicas, dosis de la toxina de prueba y modo de aplicarla (bajo la piel o en el seno de los músculos), tanto por ciento de la sobrevivencia, etc. Esto en cuanto al método de la prueba de resistencia; y por lo atinente a la apreciación de la eficacia, basada en la antitoxinemia, el grado mínimo de ésta que habría de exigirse.

La determinación de eficacia por la apreciación de la antitoxinemia actual, es dificultosa. En cambio, la determinación de la resistencia a la toxina es fácil.

Parece probado que los cobayos que soportan la inyección de 100 mm. contienen de 0,1 a 0,5 de U. de antitoxina circulante por centímetro cúbico. Por tanto, la exigencia de eficacia mínima de la Farmacopea británica, que se basa en la apreciación del nivel antitoxinémico, podría llenarse basándose en la relación existente entre «resistencia» y «anti-

toxinemia»; pero esto sólo puede aceptarse con toda clase de reservas, porque la resistencia en rigor no estriba en la antitoxinemia «actual»; lo que cuenta en la inmunización activa antitóxica es la *aptitud potencial* para generar el anticuerpo; aptitud variable de unos animales a otros. Por esto hay que fijar el tanto por ciento de animales sobrevivientes que debe ser aceptado como mínimo.

Si la inyección de toxina se hace por vía venosa, se observa una relación muy estrecha entre antitoxinemia y resistencia; si se inyecta la toxina bajo la piel, la relación es menos evidente y, menos aún, si se opera por vía muscular, que es la más lesiva, dado que el veneno tetánico camina por los nervios, en los que se defiende contra el anticuerpo circulante.

Este último hecho explica la observación de que no siempre los animales con alta antitoxinemia se muestran más refractarios a la prueba directa (Petrovich).

Varios inmunólogos de nota de la Reunión de referencia fueron partidarios de la prueba directa (Ikic, d'Antona, Vygodtchikof, entre ellos).

La complejidad del tema es innegable, y la Primera Reunión Europea de Estandardización Biológica ha servido para demostrarlo una vez más. Un hecho incontrovertible es la posibilidad de hacer refractario a un organismo animal receptible para el tétanos. Demostrado esto, precisa basarse en una experiencia de vacunación humana de grandes vuelos e inquirir qué criterio experimental se siguió para aceptar la eficiencia de la vacuna empleada. Tal criterio es racional.

Workman (W. G.) en comunicación personal a Nusret H. Fiser, de Ankara, hizo ver que la Armada americana, durante la segunda guerra mundial, se vacunó con toxoide líquido valorado por el método N. I. H. de los Estados Unidos. La eficacia de dicha vacuna quedó demostrada; por tanto, tal método es indudablemente eficaz. Además, es de fácil ejecución.

Inspirándonos en este procedimiento, nosotros operamos del siguiente modo, con las vacunas de nuestra obtención:

Toxoide líquido.—Como la dosis total para vacunar a los humanos es de 5 c. c. (una inyección de 1 c. c. y dos de 2 c. c.), inyectamos a los cobayos 5/3 = 1,66 c. c. bajo la piel de 20 cobayos. Pasadas seis semanas, a diez les inyectamos 10 mm. y a diez 100 mm. bajo la piel. Exigimos la sobrevivencia del 100 por 100 del primer lote, y un tanto por cien-

to elevado del segundo. Corrientemente, del segundo lote se salvan todos.

Toxoide precipitado.—La dosis total para vacunar a los humanos es de 2 c. c. (una inyección de 1 c. c. y otra pasado un mes como mínimo). Inyectamos 0,66 c. c., o sea 1/3 de la dosis total inmunizante. Pasadas seis semanas, deben resistir el 100 por 100 a 100 mm.

Teóricamente esta protección significa que los animales tienen entre 0,1 y 0,5 de unidad actual. La realidad es otra porque, como hemos dicho, los animales tienen un estado de inmunidad potencial, un estado enérgico que les permite responder al estímulo de la inyección tóxica con una elevación antitoxínica evidente.

Estas vacunas que obtenemos, a la dosis de 1 c. c. en el cobayo, le protegen al término de treinta días contra más de 1.500 mm.

Un lote de vacuna con las expresadas cualidades protectoras fué ensayado mediante la prueba oficial canadiense por el propio Greenberg. Como es sabido, según dicho método, para que una preparación sea aceptable ha de tener una eficacia no inferior al 60 por 100 de la del patrón canadiense. Nuestra vacuna arroja el 75 por 100 de eficacia con relación al *standard* con el que trabajan en Otawa.

El método que emplean Greenberg y sus colaboradores es muy científico; también lo es el de Prigge. De este último autor propugnamos nosotros, en España, la metódica para valorar las vacunas antidiftéricas y adquirimos el convencimiento de que era inadecuada para la experimentación rutinaria. Algo de esto le ocurre al método de Greenberg, porque requiere 60 cobayos para el *standard* y 60 para cada una de las muestras de vacunas que se énsayen.

En una exposición compendiada nuestra, aún inédita, hemos tratado la interesante cuestión de la vacuna antitetánica, conquista magna que ha sido posible por lo que, con toda propiedad, ha denominado d'Antona la «era anatoxínica». El desconocimiento, o el olvido, han dejado al remedio de referencia en un lugar secundario. Es incomprensible cómo, hoy en día, estando reconocida universalmente la eficacia de la vacuna antitetánica, cuyo émpleo correcto pone a cubierto de una infección, por fortuna no muy frecuente, mas llena de dramatismo y justamente temible, que tiene un modo de aplicación sistematizado y que evita la inyección del suero antitetánico, con sus desagradables contingencias subsiguientes; es incomprensible, repetimos, que no se utilice sino rara vez.

El descubrimiento de las anatoxinas ha permitido luchar eficazmente contra la difteria y el tétanos; pero, así como la vacunación contra aquélla ha prosperado hasta alcanzar el privilegio justísimo de la obligatoriedad, la inmunización activa contra la otra infección no ha merecido más que elogios y el reconocimiento científico de su eficacia, pero no ha pasado de ahí su triunfo porque nadie se somete a su acción en nuestra patria.

Adentrándonos en el terreno del laboratorio, prescindiendo de insistir sobre el abandono inexplicable de la vacuna antitetánica, que es el remedio del presente y del porvenir contra la infección que protege, y volviendo a lo expuesto y discutido en la Primera Reunión de Estandardización Biológica de Lyon, tenemos que convenir todos en que en ella se ha deducido la eficacia por el interés puesto por los inmunólogos para defender sus puntos de vista acerca de los métodos que midan el valor inmunizante de las preparaciones; mas se ha desprendido también de las múltiples aportaciones una absoluta falta de unificación del criterio adoptable para las comprobaciones de las preparaciones vacunantes.

Citaremos brevemente los métodos más destacados.

Farmacopea francesa.—Admite la potencia floculante, exigiendo 20 u. por centímetro cúbico.

Farmacopea británica.—Exige inyectar bajo la piel, a un mínimo de 9 cobayos de 250-350 grs., 5 c. c. de vacuna, si es toxoide simple, o, si se trata del precipitado por el alumbre, 1 c. c. en inyección única, o en dos dosis de 0,1 administradas con un intervalo no superior a cuatro semanas.

Al término de mes y medio de la inyección única, y a los quince días de la segunda inyección, dos tercios, cuando menos, de los animales han de poseer en el suero sanguíneo un mínimo de 0,05 de unidad por centímetro cúbico.

Prueba del «National Institute of Health» de Estados Unidos.—Toxoide simple.—A un mínimo de 10 cobayos (300-400 grs.) se les inyecta, bajo la piel, como máximo, 1/3 del volumen del toxoide (no diluído) recomendado como dosis total inmunizante, inyectando a cada uno de los animales, pasado no más de mes y medio, 10 mm. como mínimo, en 2 c. c., debiendo sobrevivir el 80 por 100, por lo menos, durante diez días.

Toxoide precipitado.—Exigen un cierto nivel antitoxinémico en los animales inyectados.

Método empleado en Canadá.—El método seguido por Greenberg y sus colaboradores está basado en el índice de protección de muchedumbre de animales, empleando varias diluciones de *standard* y antígeno problema. Precisan alrededor de 60 cobayos para el *standard* y otros tantos animales para las muestras de vacuna en estudio.

Método de Prigge.—Es análogo al que este autor ideó para valorar las vacunas antidiftéricas y que nosotros publicamos oportunamente. (An. Instituto Llorente, 1943.)

No hay unificación de métodos. Es cierto que con las vacunas antidiftéricas ocurre algo parecido, pero no tan agudamente ostensible, porque en éstas se precisa siempre el número de «unidades floculantes» y si bien, como Prigge señaló, en el factor K de la fórmula U. I. = K $\sqrt{}$ U. F. interviene no sólo la materia coadyuvante sobreañadida (gel alumínico), sino la composición del medio de cultivo, donde el b. de Loeffler cede el sustrato antigénico, existe un mínimo de referencia, porque la unidad floculante tiene la universalidad inherente a un fenómeno de constancia y regularidad, no así la unidad floculante antitetánica, cuya determinación no se puede lograr en todos los casos. Hay que declarar con toda sinceridad que, aun disponiendo de toxinas tetánicas potentes, no se logra siempre regularidad ni constancia al probarlas con el patrón floculante proporcionado por la O. M. S. Por el contrario, regularidad y constancia son características de la floculación al poner frente a frente la toxina diftérica y el patrón floculante de la O. M. S.

Este hecho imposibilita, a nuestro juicio, uniformar las vacunas antitetánicas desde tal punto de vista. Bien es cierto que la unidad floculante, aun tratándose de la diftérica, no informa bien, como aduce Prigge, del valor inmunizante.

Podemos, ciertamente, deducir la potencia de protección experimentalmente, y tenemos buenas pruebas de que, partiendo de toxoides provenientes de toxinas tetánicas potentes y, en todo caso, concentrándolas con arreglo a técnicas especiales, se tiene una base firme para obtener excelentes vacunas, sobre todo, naturalmente, si se adsorben con geles alumínicos.

La prueba de valoración de los toxoides tetánicos, según nuestra

Farmacopea, consiste en inyectar a cobayos de 300-400 grs., y con veinte días de intervalo, dos dosis de 1 c. c. del producto en estudio, con inyección a los quince días de la segunda dosis, de 10 mm., a la que deben resistir los animales de prueba.

De todo lo expuesto destaca, ciñéndonos exclusivamente a lo concerniente a la vacuna antitetánica, que se carece de una técnica de valoración universal y, por tanto, de una unidad de protección. Los sanitarios, pues, tienen que confiar en que los preparadores de vacunas y los controladores velan por la excelente calidad de los productos que manejan, y que las dosis que figuran en los preparados de la industria obedecen a un mínimo de protección que garantice su eficiencia; pero los sanitarios no pueden manejar los productos vacunantes anatoxínicos hablando de unidades, como pueden hacerlo con las antitoxinas o los antibióticos.

Se impone que en sucesivas reuniones los miembros de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología se esfuercen en ceder cada uno un poco de lo que puede haber de natural amor propio para que se llegue a un procedimiento hacedero y útil.

Ciertamente, los inmunólogos que muestran mayor entusiasmo matemático tienen que convenir en que sus métodos, si muy científicos, son muy onerosos, porque todos parten de trabajos con muchedumbre de cobayos. Ahora bien: si se llegara a una metódica empleando el ratón blanco, podría cambiar el panorama de tales procedimientos, porque dicho animal se inmuniza muy bien contra el tétanos.

Hemos inyectado 1 c. c. de nuestra vacuna precipitada a un lote de 10 ratones, observando que resisten a partir de las seis semanas a dosis progresivas de toxina, del siguiente modo:

1.ª dosis			10 mm.
2.ª	»	a los 6 días de la 1.ª	20 mm.
3.ª	»	a los 4 días de la 2.ª	50 mm.
4.ª	»	a los 6 días de la 3.ª	100 mm.
5.ª	»	a los 6 días de la 4.ª	200 mm.
6.ª	»	a los 7 días de la 5.ª	500 mm.
7.ª	»	a los 4 meses de la 6.ª	900 mm.

El 100 por 100 resiste perfectamente a estas enormes dosis de

toxina, en cuyas pruebas no se prescinde nunca de la inyección, a tres animales, de 1 mm., con producción de muerte al cuarto día.

Otro ensayo que hemos hecho a este respecto ha consistido en inyectar a 10 ratones 1 c. c. por *vía subcutánea*, ensayando su comportamiento para la toxina pasado solamente un mes.

1.ª dosis.	A los treinta días de la inyección de vacuna. Dosis toxínica	100 mm.
2.ª dosis.	A los cinco días de la inyección de la 1.ª dosis toxínica	1.500 mm.

El 100 por 100 de los animales estaba absolutamente protegido contra la toxina.

Koerber, Mook y Pillemer (citados por J. Ruiz y R. Ibáñez en Met. Biol. de Valoración de Medicamentos, 1955); Greenberg y Morrell, e Ipsen y colaboradores (citados por Nusret H. Fisek en la comunicación a la Reunión en Lyon, 1955), han indicado ya la posibilidad del empleo del ratón blanco, cuya inmunización contra el veneno tetánico es un hecho positivo.

En principio, pues, sería adecuado el ratón blanco para estudiar un método basado en el empleo de este animal, que, comparado con el cobayo, reduce la magnitud de las instalaciones y resulta más económico y de dos patrones internacionales: uno, toxoídico, y otro, toxínico.

No obstante, el mismo Greenberg (cita de Fisek) recela de una tal adopción por haber observado que el ratón tiene una respuesta distinta a dosis establecidas de diferentes toxoides, y recomienda ser prudentes antes de prestar a los resultados obtenidos la confianza que nos merece el cobayo.

Esperemos que la actual Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, recientemente reunida en Roma para ocuparse en otras materias referentes a la comprobación, aborde con entusiasmo este punto concreto sobre el que hemos expuesto algunos métodos y algunas ideas, más que nada tratando de insistir en la necesidad de la unificación de métodos de estandardización de las vacunas antitetánicas y de la fijación de la «unidad», habida cuenta de que se trata de remedios eficaces y de una trascendencia incalculable.

RESUMEN

Con motivo de las aportaciones hechas a la Primera Reunión Europea de Normalización Biológica, se comenta la precisión de unificar las técnicas de valoración de las vacunas antitetánicas, insistiendo en la necesidad de que la inmunización activa contra el tétanos se practique en sustitución de la sueroprofilaxia.

SUMMARY

By reason of the communication presented to the First European Meeting of Biological Standardization, the author comments about the unification of technics for valuation of the antitetanus vaccines. He prefer the active immunization insted of the serum prophylaxis.

BIBLIOGRAFIA

(1) Rapport sur la standardisation des produits destinés à la Prophylaxie du Tétanos. (Premier Rencontre Européenne de Standardisation Biologique. Lyon. 22-25 junio 1955.)

(2) J. Ruiz y R. Ibáñez: Métodos biológicos de valoración de medicamentos. 1955.

(3) A. B. Wadswort: Standard Methods.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

ACCION DE LOS AGENTES QUIMICOS SOBRE LOS VIRUS Y EXPERIENCIAS CON EL ANTIVARIOLICO CULTIVADO EN HUEVOS DE GALLINA (Conclusión)

POR
M.ª Luisa Alonso

ESTUDIO EXPERIMENTAL

EXPERIENCIA NUM. I

Partimos de 14 embriones y membranas alantoides procedentes de un lote de huevos inoculados con 0,25 c. c. de un filtrado de pulpa dérmica de ternera obtenido según técnica de Monteiro y Godinho.

El material embrionario recogido en frascos de boca ancha fué almacenado durante cinco meses en helera a temperatura de —20° C. Pasado este tiempo, la pulpa embrionaria se descongeló lentamente en fresquera (a + 8° C.), y una vez triturada en Turmix, se almacenó un mes más a baja temperatura y seguidamente se hicieron finos triturados de pulpa al 1/10, que se suspendieron en las soluciones de glicerina fosfatada (Serie A), tamponadas a pH 5, 6, 7, 8 y la solución 9 con glicocola; en las de cisteína (Serie C), diluída al 1/1000 en solución salina-agar al 2/1000, ajustadas con NaOH 0,1n a pH H5, 6, 7, 8 y 9; y en las de veronal-veronal sódico (Serie D), ajustadas igualmente a los pH 5, 6, 7, 8 y 9. Todos los triturados suspendidos en sus respectivas soluciones fueron depositados en tubos de ensayo con tapoces de goma estériles y conservados fuera de la luz a temperatura de 18° a 22° C.

Se comenzó la experiencia haciendo una serie de pruebas de actividad (método de Groth) con cada una de las 15 suspensiones del material embrionario diluídas al 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000 en solución salina.

Una vez comproba su actividad, se repitieron las inoculaciones intradérmicas en piel de conejo cada diez días, hasta llegar al término de la experiencia.

Los dibujos que van a continuación ponen de manifiesto la forma en que han sido hechas las inoculaciones en los conejos.

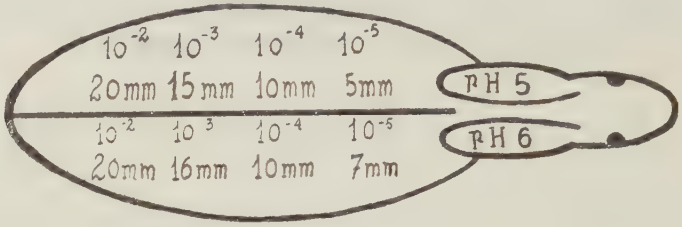


Fig. 7

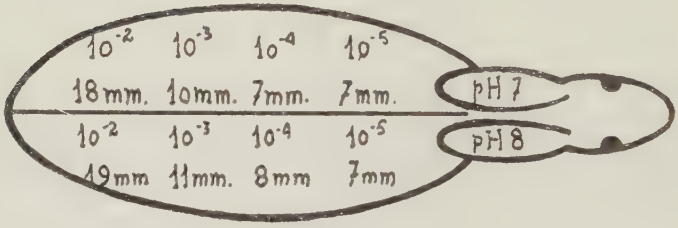


Fig. 8.

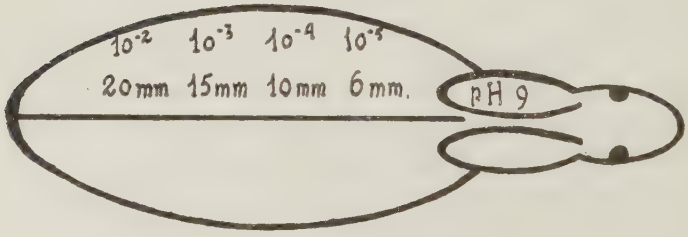


Fig. 9.

Los resultados obtenidos figuran inmediatamente después, en forma de cuadros, para dar una mayor unidad a la exposición.

Cuadros de las pruebas de actividad de los triturados suspendidos en las soluciones de glicerinas fosfatadas.

SERIE A

pH de las soluciones	Diluciones			
	10—2	10—3	10—4	10—5
Inicial.				
pH 5	20 mm.	15	10	5
pH 6	20	15	10	5
pH 7	18	10	7	7
pH 8	19	11	8	7
pH 9	20	15	10	6
10 días.				
pH 5	11 mm.	8	7	0
pH 6	15	12	10	0
pH 7	15	12	10	0
pH 8	16	10	8	0
pH 9	11	9	8	0
20 días.				
pH 5	10 mm.	8	7	0
pH 6	15	12	10	0
pH 7	15	11	11	0
pH 8	**15**	**10**	**7**	**0**
pH 9	10	9	7	0
30 días.				
pH 5	10 mm.	8	7	0
pH 6	12	10	9	0
pH 7	15	13	10	0
pH 8	14	9	7	0
pH 9	10	8	6	0
40 días.				
pH 5	6 mm.	1	0	0
pH 6	10	5	1	0
pH 7	14	12	9	0
pH 8	14	9	4	0
pH 9	10	7	5	0
50 días.				
pH 5	0 mm.	0	0	0
pH 6	5	0	0	0
pH 7	12	9	7	0
pH 8	0	0	0	0
pH 9	0	0	0	0

Cuadros de las pruebas de actividad de los triturados suspendidos en las soluciones de cisteína.

SERIE C

Inicial.

pH de las soluciones	Diluciones			
	10—2	10—3	10—4	10—5
pH 5	17 mm.	15	10	6
pH 6	20	15	11	7
pH 7	18	10	7	6
pH 8	16	10	7	3
pH 9	16	12	6	4

10 días.

pH 5	12 mm.	7	3	0
pH 6	18	12	5	0
pH 7	18	10	6	0
pH 8	16	11	5	0
pH 9	15	10	4	0

20 días.

pH 5	10 mm.	5	0	0
pH 6	16	10	4	0
pH 7	15	8	5	0
pH 8	14	7	4	0
pH 9	13	6	3	0

30 días.

pH 5	5 mm.	0	0	0
pH 6	13	8	4	0
pH 7	11	7	4	0
pH 8	10	5	3	0
pH 9	8	4	2	0

40 días.

pH 5	3 mm.	0	0	0
pH 6	8	4	1	0
pH 7	10	5	0	0
pH 8	7	3	0	0
pH 9	5	2	0	0

50 días.

pH 5	0 mm.	0	0	0
pH 6	5	3	0	0
pH 7	7	4	0	0
pH 8	7	0	0	0
pH 9	3	0	0	0

Cuadros de las pruebas de actividad de los triturados suspendidos en las soluciones de veronal-veronal sódico.

SERIE D

	pH de las soluciones	Diluciones			
		10—2	10—3	10—4	10—5
Inicial.	pH 5	18 mm.	15	10	4
	pH 6	19	14	9	5
	pH 7	20	14	9	6
	pH 8	19	14	10	6
	pH 9	20	15	10	5
10 días.	pH 5	9 mm.	5	2	0
	pH 6	12	8	5	0
	pH 7	9	6	4	0
	pH 8	10	7	5	0
	pH 9	10	6	3	0
20 días.	pH 5	6 mm.	2	0	0
	pH 6	9	5	0	0
	pH 7	9	5	0	0
	pH 8	10	5	0	0
	pH 9	8	5	0	0
30 días.	pH 5	2 mm.	0	0	0
	pH 6	5	2	0	0
	pH 7	7	3	0	0
	pH 8	8	3	0	0
	pH 9	6	2	0	0
40 días.	pH 5	0 mm.	0	0	0
	pH 6	2	0	0	0
	pH 7	6	0	0	0
	pH 8	6	2	0	0
	pH 9	4	0	0	0
50 días.	pH 5	0 mm.	0	0	0
	pH 6	0	0	0	0
	pH 7	7	0	0	0
	pH 8	4	0	0	0
	pH 9	2	0	0	0

Resultados.

Solución de glicerinas fosfatadas (Serie A).

pH 5 Presenta gran actividad inicial, que pierde en parte en los 10 primeros días, se mantiene igual hasta los 30, atenuadísima a los 40 y nula a los 50.

pH 6 Durante 20 días presenta una actividad algo menor que la inicial, que va perdiendo poco a poco hasta los 50 días, en que aún es activa.

pH 7 Desciende algo en los 10 primeros días y se mantiene en plena actividad hasta los 50 días.

pH 8 De actividad algo menor que el pH 7, la conserva bien hasta los 40 días, siendo totalmente nula a los 50.

pH 9 Pierde gran parte de su actividad en los 10 primeros días, se mantiene casi igual hasta los 40 y es totalmente nula a los 50.

Soluciones de cisteína (Serie C).

pH 5 Pierde gran parte de su actividad en los 10 primeros días, a los 20 no da lesión la suspuensión al 1/10.000, en los 30 y 40 sólo se aprecia lesión en la al 1/100, y a los 50 la actividad es totalmente nula.

pH 6 La actividad desciende paulatinamente hasta los 50 días, en que aún se aprecia lesión al 1/1000.

pH 7 Pierde progresivamente actividad en la dilución al 1/1000.

pH 8 La actividad es menor que la del pH 7.

pH 9 De actividad más atenuada que el anterior, da lugar todavía a una pequeña lesión a los 50 días con la dilución al 1/100.

Soluciones de veronal-veronal sódico (Serie D).

pH 5 Pierde gran parte de su actividad en los 10 primeros días y sigue bajando hasta ser nula a los 40.

pH 6 Aunque más activo que el anterior, pierde también rápidamente, para ser nula su actividad a los 50 días.

pH 7 Baja la actividad en los 10 primeros días, descendiendo después lenta y regularmente hasta los 50 días, en que aún se aprecia lesión en la dilución al 1/100.

pH 8 Da lugar a lesiones algo mayores que las del pH 7 y se mantiene activa hasta el final de la experiencia al 1/100.

pH 9 Pierde gradualmente en los 50 días, en que aún se aprecia una pequeña lesión en la dilución al 1/100.

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (A), (C), (D).

pH 5 (A) Actividad nula a los 50 días.
pH 5 (C) Actividad totalmente nula a los 50 días.
pH 5 (D) Actividad nula a los 40 días.

pH 6 (A) Activo a los 50 días al 1/100.
pH 6 (C) Activo a los 50 días al 1/1000.
pH 6 (D) Actividad nula a los 50 días.

pH 7 (A) Activo a los 50 días en todas las diluciones.
pH 7 (C) Activo a los 50 días al 1/1000.
pH 7 (D) Activo a los 50 días al 1/100.

pH 8 (A) Actividad nula a los 50 días.
pH 8 (C) Activo a los 50 días al 1/100.
pH 8 (D) Activo a los 50 días al 1/100.

pH 9 (A) Actividad nula a los 50 días.
pH 9 (C) Activo a los 50 al 1/100.
pH 9 (D) Activo a los 50 días al 1/100 (lesión muy pequeña).

Resumen.

Soluciones de la Serie (A).—Conservando bien su actividad en los pH 5 y 6, es muy activa hasta los 50 en el pH 7, y pierde totalmente su actividad en los pH 8 y 9, después de los 40 días.

Soluciones de la Serie (C).—Mantienen una actividad muy regular durante toda la experiencia. Con los pH 5 y 6 y los 8 y 9, se dió lugar

a lesiones con las diluciones al 1/100 a los 50 días. El pH central 7 demostró su actividad a los 50 días en las diluciones 1/100 y 1/1000.

Soluciones de la Serie (D).—De nula actividad a los 40 días en el

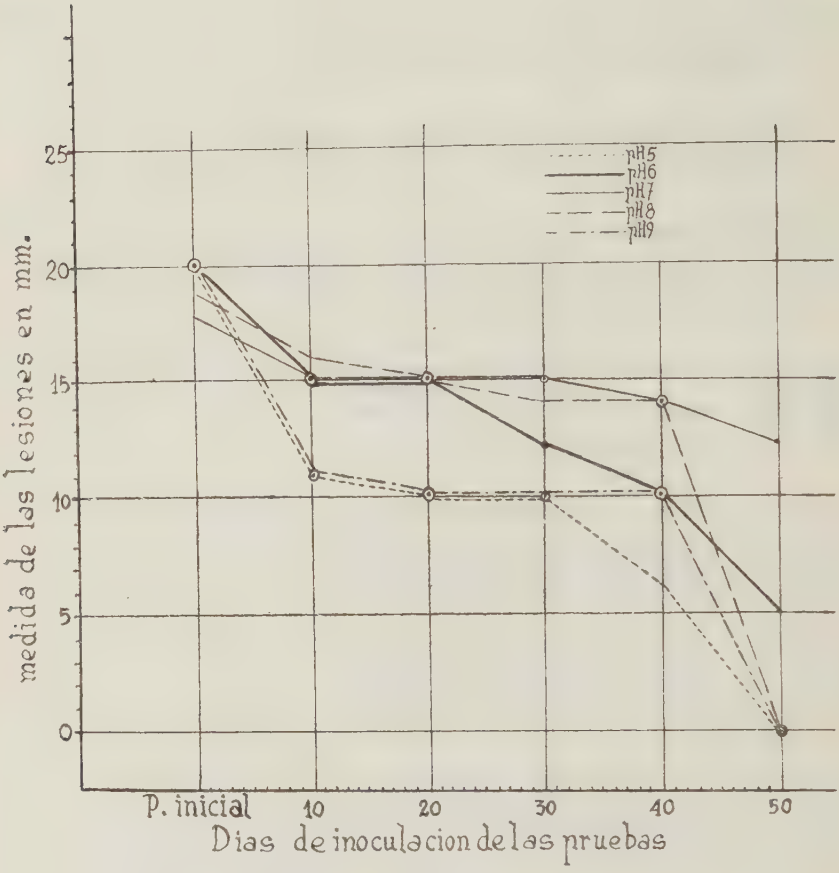


FIG. 10.

Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie A.

pH 5, e igualmente nula a los 50 en el pH 6, se muestra activa hasta los 50 en la dilución al 1/100 en el pH 7, conservándose activa en esta dilución hasta el final de la experiencia en los pH 8 y 9.

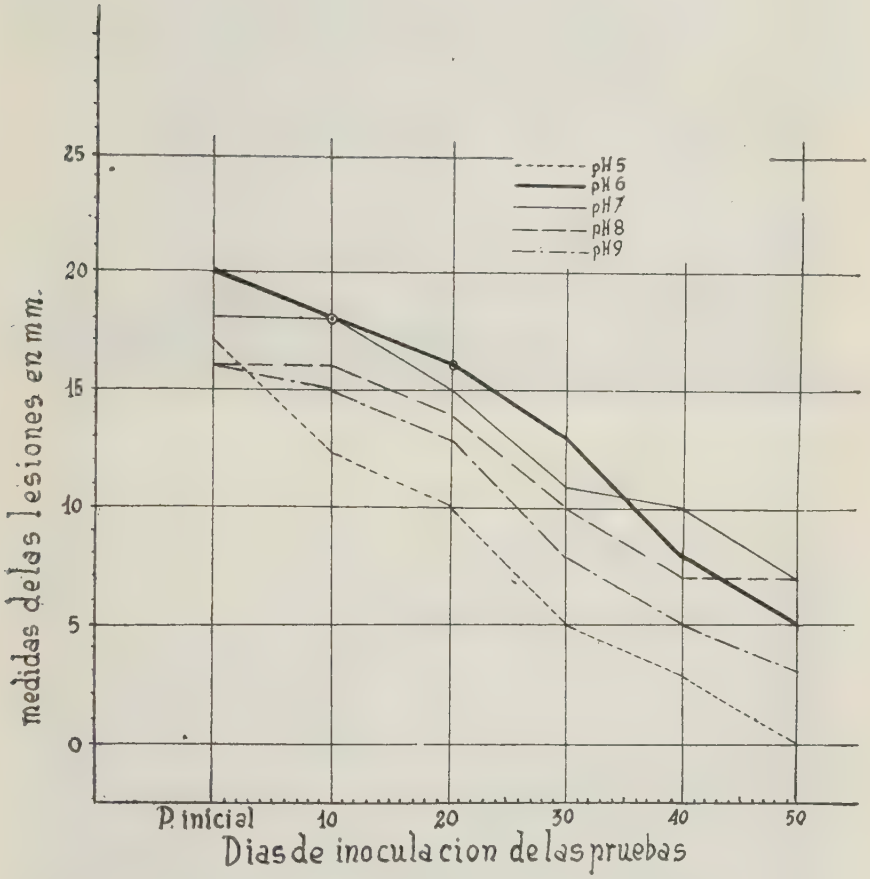


FIG. 11.

Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie C.

Esta experiencia núm. I ha sido expuesta con expresión de todos los resultados obtenidos, para dar idea exacta del curso de los trabajos realizados.

En las restantes experiencias hemos suprimido la detallada exposición anterior, a fin de simplificar la lectura de nuestro trabajo, reseñando únicamente las conclusiones, que dan clara idea de los resultados logrados.

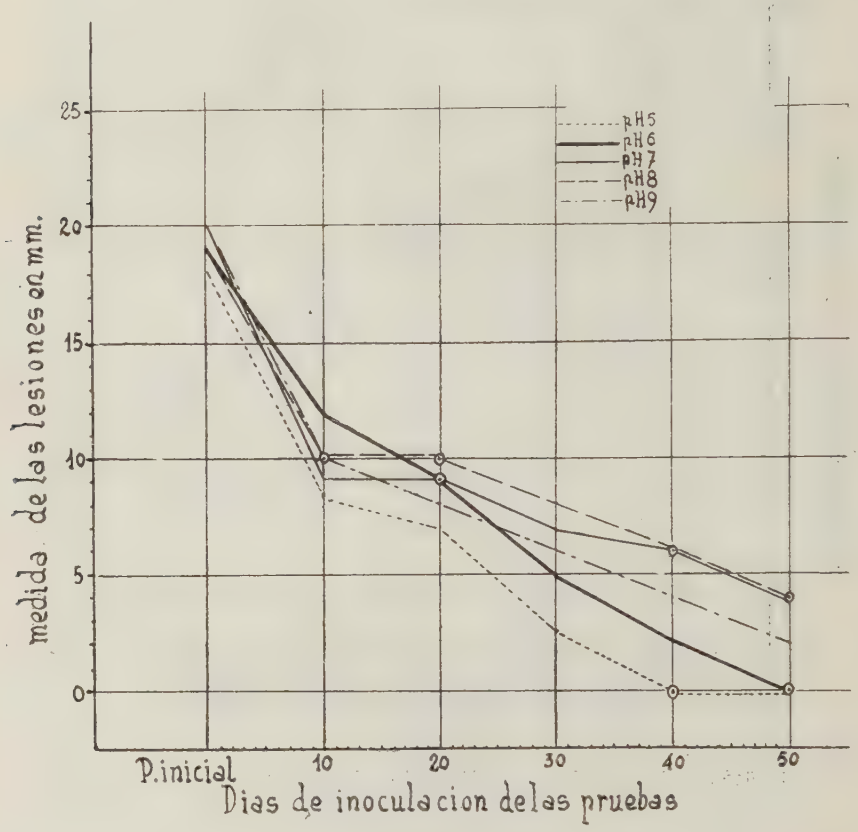


FIG. 12.

Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie D.

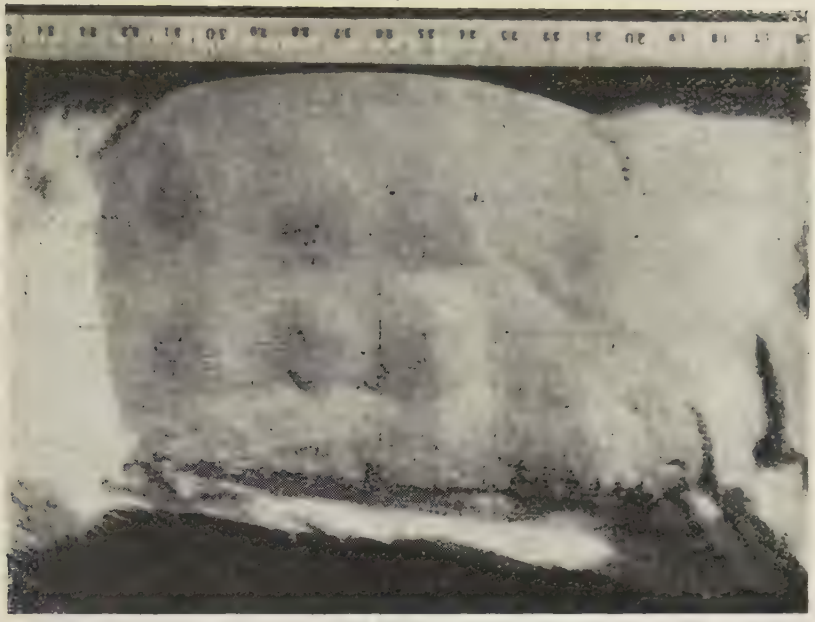


FIG. 13.
Pruebas de actividad inicial de las suspensiones de las Series **A y C** a pH 7 (Observación al 5.º día).

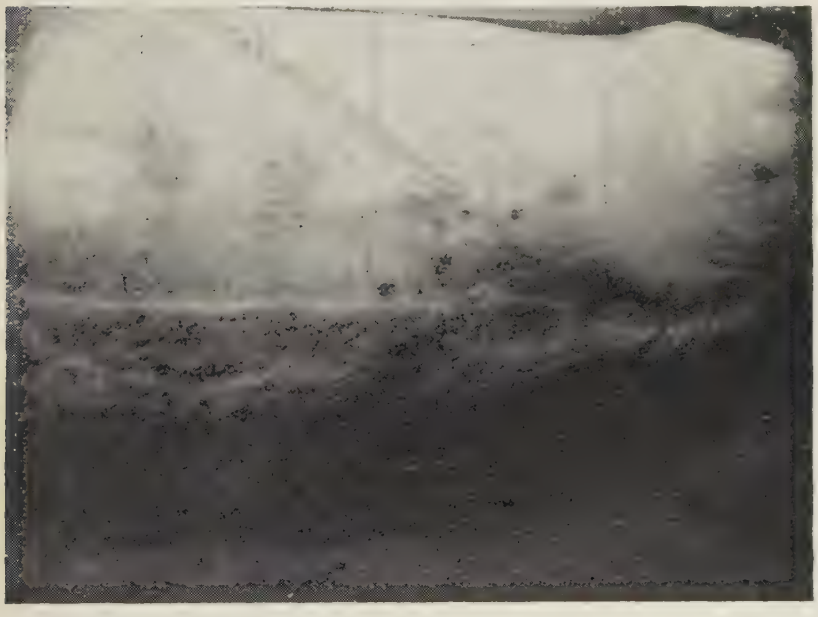


FIG. 14.
Pruebas de actividad inicial de las suspensiones de la Serie D. pH 7 (Observación al 5.º día).

EXPERIENCIA NUM. II

Para esta experiencia hemos partido de un triturado de 12 embriones y membranas alantoides procedentes de huevos inoculados con 0,25 c. c. de una dilución al 1/60 de un filtrado de pulpa dérmica de ter-

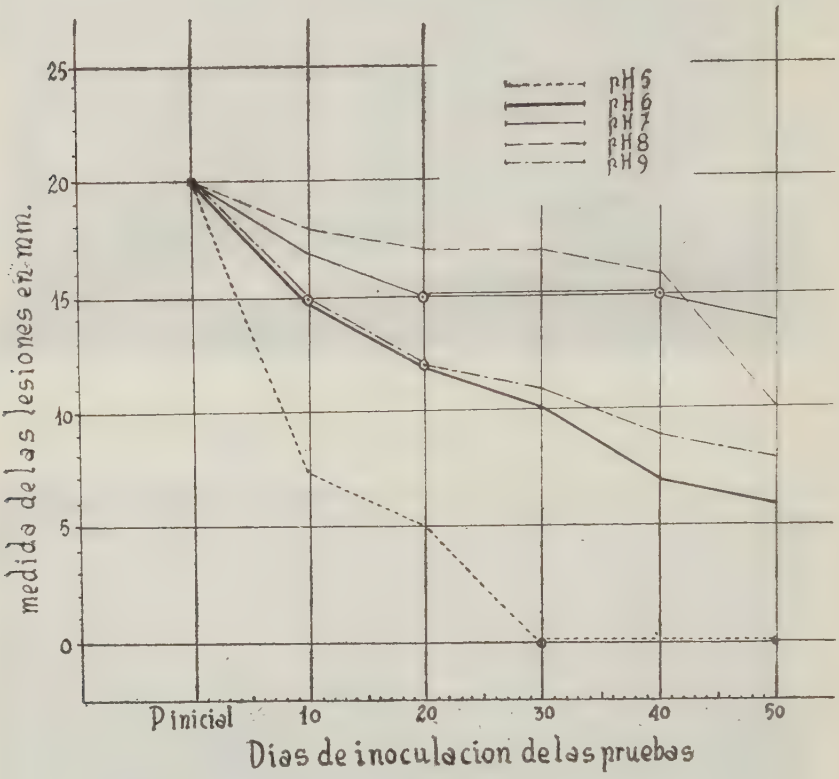


FIG. 15.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de ambriones al 10^{-2} de la Serie A.

nera obtenido en las mismas condiciones que el utilizado en la experiencia anterior (núm. I).

Después de tres meses de conservación a baja temperatura (—20° C.), se trituró el material embrionario y nuevamente se almacenó durante un mes más. De esta pulpa embrionaria descongelada lentamente, se hi-

cieron finos triturados en mortero, que se suspendieron al 1/10 en las mismas soluciones de la experiencia anterior y a los mismos pH.

Las pruebas de actividad inicial y las posteriores cada 10 días (hasta

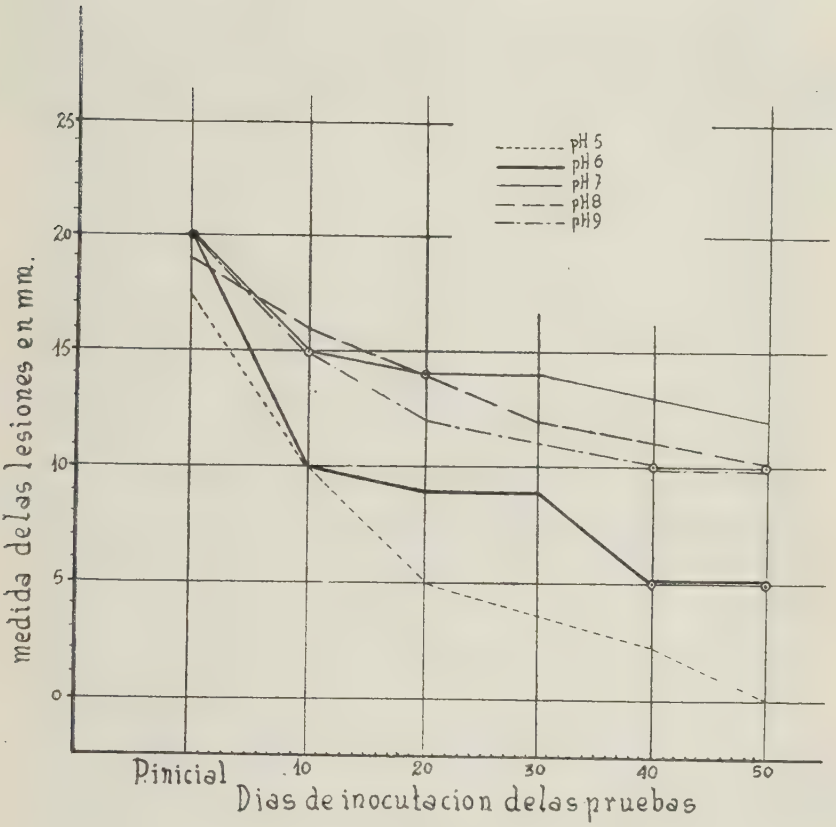


FIG. 16
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de ambriones al 10^{-2} de la Serie C.

los 50), así como las condiciones a que estuvo sometido el material embrionario, fueron semejantes a las ya indicadas en la experiencia anterior.

Resultados.

Soluciones de glicerina fosfatadas. Serie (A).

pH 5 Pierde gran parte de su actividad en los 10 primeros días, para seguir bajando y ser ya nula a los 30.

pH 6 Declina lentamente de actividad hasta los 50 días, en que todavía da lesiones al 1/1000.

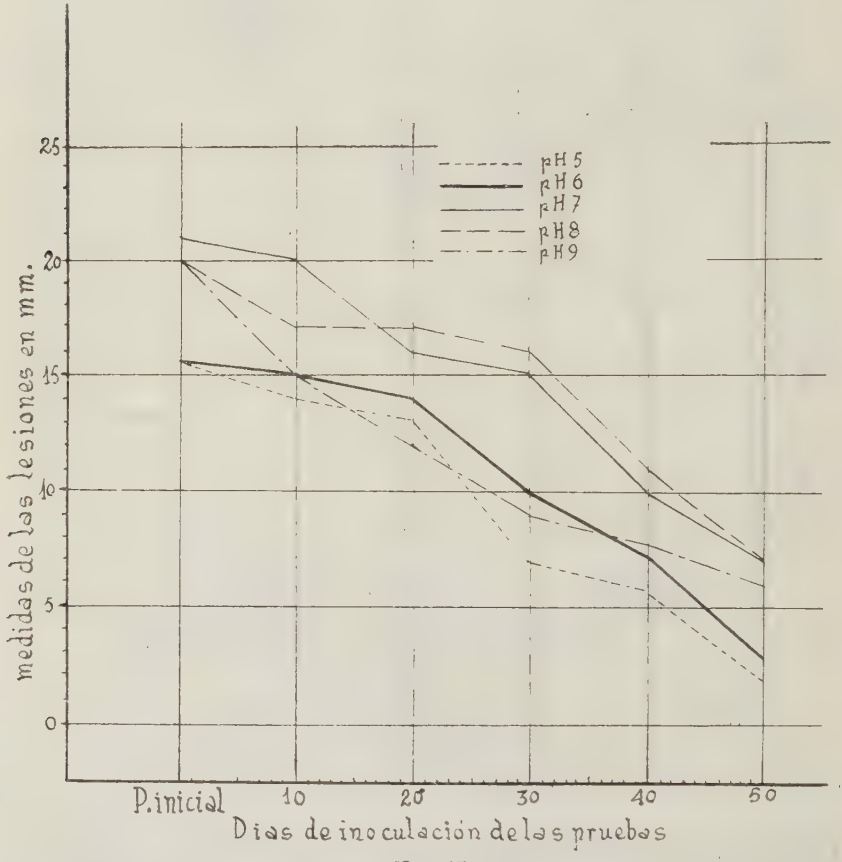


FIG. 17.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de ambriones al 10^{-2} de la Serie D.

pH 7 Mantiene casi íntegra la actividad a los 10 días y va perdiendo lentamente hasta los 50, en que aún da lesiones hasta al 1/10.000.
pH 8 Es algo menos activo que el anterior; sigue la misma curva.
pH 9 Pierde poco en los 10 primeros días y desciente lentamente hasta los 50, en que aún es activo al 1/1.000.

Soluciones de cisteína. Serie (C).

pH 5 Desciende la actividad en los 10 primeros días, para ir luego bajando a lo largo de la experiencia y dar lesiones a los 40 al 1/100.
pH 6 La pérdida mayor fué a los 10 días, descendiendo después lentamente hasta los 50, en que aún se muestra activo en la dilución al 1/100.
pH 7 Resulta más activo que los anteriores, desciende lentamente y es todavía activo a los 50 días al 1/1.000.
pH 8 De menos actividad que el anterior, sigue la misma curva descendente.
pH 9 Muy similar al pH 8, da también lesiones a los 50 días al 1/1.000.

Soluciones de veronal-veronal sódico. Serie (D).

pH 5 Pierde en los 10 primeros días para después estabilizarse y seguir descendiendo hasta los 50, en que todavía es activo a 1/100.
pH 6 Algo más activo que el pH 5, sigue la misma curva descendente hasta los 50 días.
pH 7 Su actividad decrece regularmente hasta los 50 días, en que todavía es activo al 1/100.
pH 8 De semejante actividad que el anterior, sigue la misma curva durante los 50 días.
pH 9 La pérdida de actividad sigue el mismo proceso descendente que en los anteriores pH, si bien es algo menos activo que ellos.

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (A), (C) y (D).

pH 5 (A) Activo hasta los 20 días.
pH 5 (C) Activo a los 40 días al 1/100.
pH 5 (D) Activo a los 50 días al 1/100.

pH 6 (A) Activo a los 50 al 1/1.000.
pH 6 (C) Activo a los 50 días al 1/100.
pH 6 (D) Activo a los 50 días al 1/100.

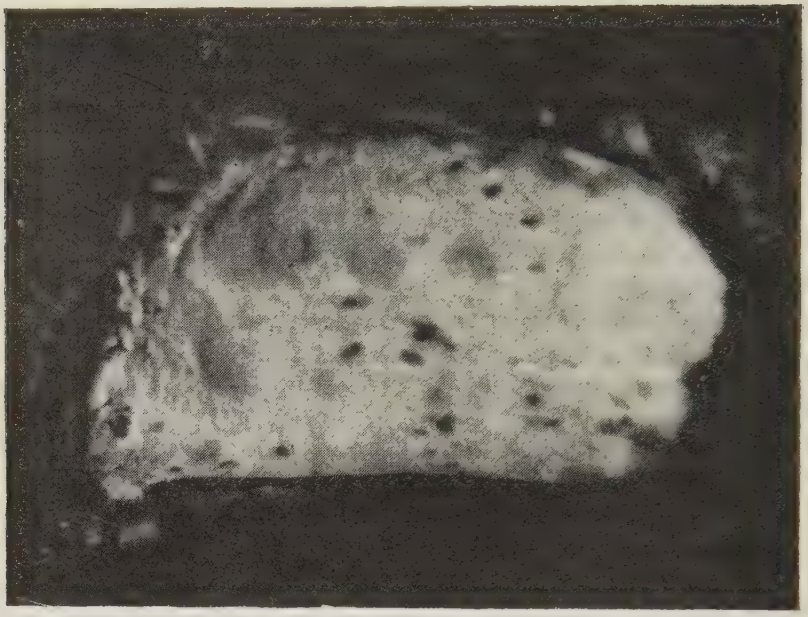


FIG. 18.
Pruebas de actividad a los 50 días de las suspensiones de la Serie A. pH 7 y 8 (Observación al 5.º día).

pH 7 (A) Activo a los 50 días al 1/10.000.
pH 7 (C) Activo a los 50 días al 1/1.000.
pH 7 (D) Activo a los 50 días al 1/1000.

pH 8 (A) Activo a los 50 días al 1/10.000.
pH 8 (C) Activo a los 50 días al 1/1.000.
pH 8 (D) Activo a los 50 días al 1/100.

pH 9 (A) Activo a los 50 días al 1/1.000.
pH 9 (C) Activo a los 50 días al 1/1.000.
pH 9 (D) Activo a los 50 días al 1/100.

Resumen.

Soluciones de la Serie (A).—De poca actividad en el pH 5, declina lentamente en el pH 6, se mantiene muy activo en los pH 7 y 8, conservando el pH 9 su actividad a los 50 días ál 1/1.000.

Soluciones de la Serie (C).—De regular actividad en los pH 5 y 6, se conserva muy activo en el pH 7 y pierde lentamente hasta el final de la experiencia en los pH 8 y 9.

Soluciones de la Serie (D).—Se mantiene activo hasta los 50 días en todos los pH, destacando el pH 7 por su mayor actividad.

EXPERIENCIA NUM III

Un lote de huevos fecundados de 12 días de incubación fueron inoculados con 0,25 c. c. de la suspensión al 1/100 en caldo común, con una cepa de virus testicular lapino muy activa (liofilizada).

Con los embriones y membranas alantoides procedentes de estos huevos, formamos una vez triturados un lote de pulpa.

Después de un mes en nevera a —20° C., se descongeló la pulpa, que triturada finamente en mortero se suspende al 1/10 en las soluciones correspondientes a esta experiencia. Glicerinas fosfatadas Serie (B), y veronal sódico Serie (E).

Las pruebas de actividad inicial y las siguientes se hicieron con cinco diluciones de la Serie (B) y otras cinco de la Serie (E) de cada pH. Estas diez diluciones se inocularon en un solo conejo para de este modo descartar los errores propios de la distinta receptividad de los animales y poder comparar con mayor acierto la acción sobre el virus de las sustancias químicas que integran las soluciones de las Series (B) y (E).

Resultados.

Soluciones de glicerinas fosfatadas. Serie (B).

pH 5 De gran actividad a los 10 días, pierde paulatinamente para ser casi nula a los 35 y 48 días.

pH 6 Desciende poco durante toda la experiencia, conservando gran parte de su actividad a los 48 días.

pH 7 Semejante al anterior, produjo mayores lesiones iniciales y al final de la experiencia.

pH 8 De actividad muy parecido al anterior, con lesiones finales mayores.

pH 9 Algo menos activo que los anteriores. De todas formas, destaca la gran actividad de estos tres últimos pH durante toda la experiencia.

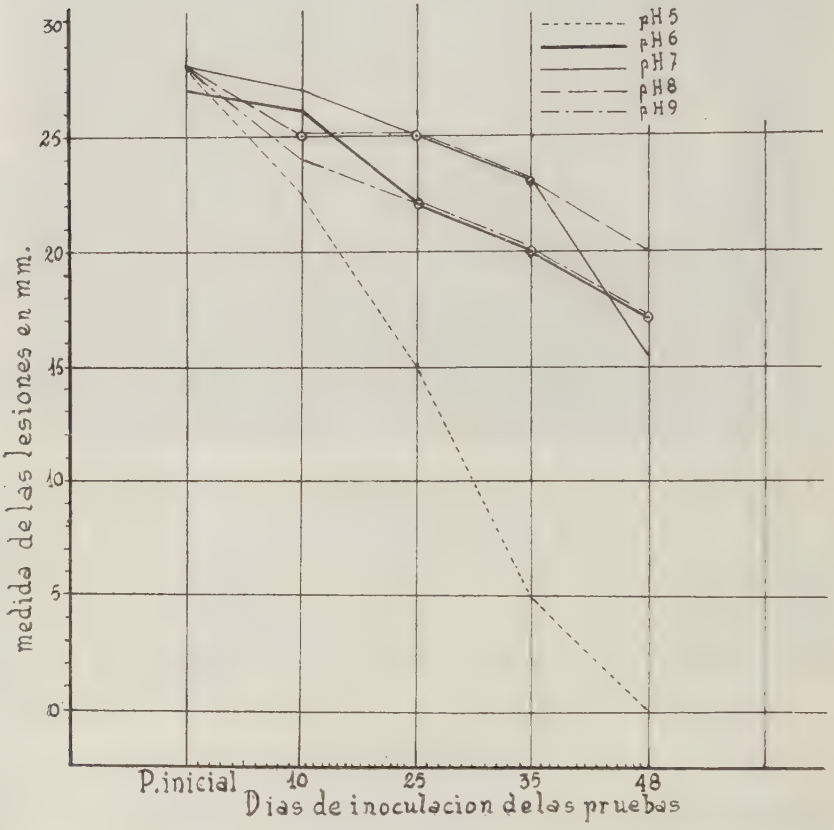


FIG. 19.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie B.

Soluciones de veronal sódico. Serie (E).

pH 5 Pierde mucha actividad a los 10 días, descendiendo rápidamente a continuación para ser nula a los 35 días.

pH 6 Pierde actividad a lo largo de la experiencia, conservando todavía buena actividad al final de la misma.

pH 7 Sigue una curva de pérdida muy regular, conservándose todavía muy activo a los 48 días.

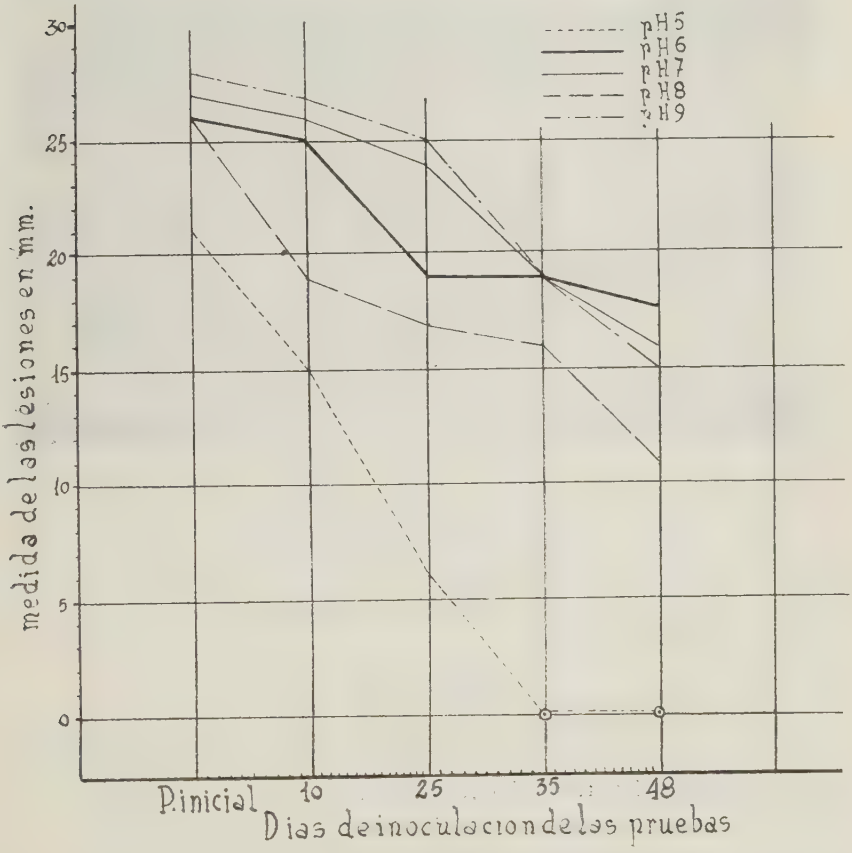


FIG. 20.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-3} de la Serie B.

pH 8 Menos activo que el anterior, sigue también un descenso de actividad muy regular.

pH 9 De curva descendente semejante a los anteriores. La actividad final entre ellos no es muy diferente.

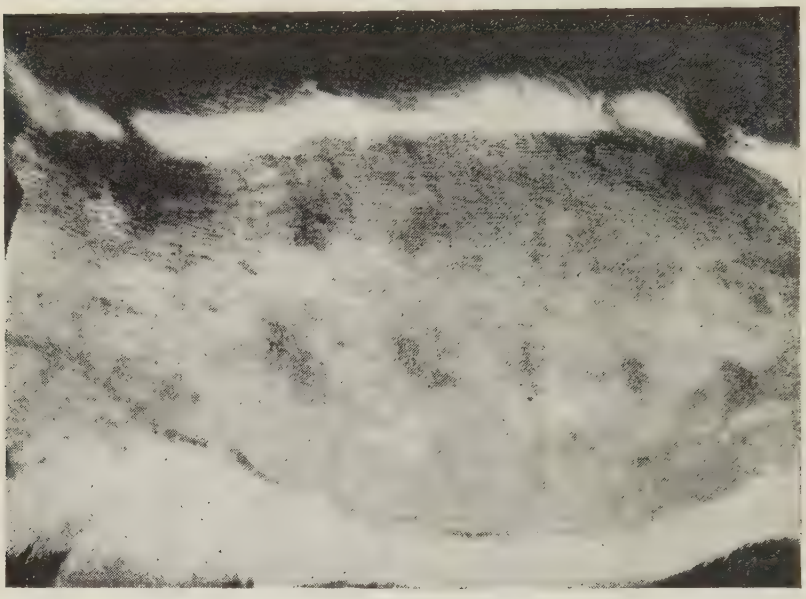


FIG. 21.
Pruebas de actividad a los 25 días de las suspensiones de las Series B y E, pH 7 (Observación al 5.º día).

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (B) y (E).

pH 5 (B) Muy poco activo a los 35 y 48 días.
pH 5 (E) Actividad nula a los 35 días.

pH 6 (B) Buena actividad a los 48 días.
pH 6 (E) Buena actividad a los 48 días.

pH 7 (B) Muy activo a los 48 días.
pH 7 (E) Muy activo a los 48 días.

pH 8 (B) Muy activo a los 48 días.
pH 8 (E) De actividad algo menor a los 48 días.

pH 9 (B) Buena actividad a los 48 días.
pH 9 (E) Buena actividad a los 48 días.

Resumen.

Soluciones de la Serie (B).—De poca actividad las del pH 5 a los 35 días y 48 días, se mantienen muy activas las de los restantes pH hasta el final de la experiencia, destacando las del pH 8.

Soluciones de la Serie (E).—De actividad nula las del pH 5 a los 35 días, desciende la actividad lentamente en los restantes pH hasta el final de la experiencia. El pH 7 se muestra muy activo a los 48 días.

EXPERIENCIA NUM. IV

Un lote de huevos fecundados de 12 días de incubación se inocularon con las mismas dosis de la experiencia anterior y con la cepa testicular en idéntica dilución.

La pulpa embrionaria constituída por los embriones y alantoides, fué almacenada durante cuatro meses en helera a baja temperatura, previa trituración.

Esta pulpa descongelada fué nuevamente triturada en mortero con arena, y el fino triturado suspendido al 1/10 en las soluciones correspondientes de glicerinas fosfatadas Serie (B) y de veronal sódico Serie (E), sometido a las mismas condiciones de las experiencias anteriores.

Las inoculaciones fueron practicadas, tanto las iniciales como las siguientes, con diluciones hasta al 1/1.000.000, y en un mismo conejo las de la Serie (B) y las de la Serie (E) de cada pH.

Resultados.

Soluciones de glicerinas fosfatadas. Serie (B).

pH 5 Pierde rápidamente a los 10 días para ir descendiendo y ser nula a los 30.
pH 6 La actividad va bajando regularmente durante la experiencia, y es nula a los 50 días.

pH 7 Hasta los 20 días es prácticamente de la misma actividad, después desciende regularmente para ser activa todavía a los 50.

pH 8 No pierde en 40 días; a los 50 da lesiones mayores que el anterior.

pH 9 Casi igual que el pH 8, las lesiones son muy parecidas en tamaño.

Soluciones de veronal sódico. Serie (E).

pH 5 Pierde rápidamente actividad para ser nula a los 30 días.

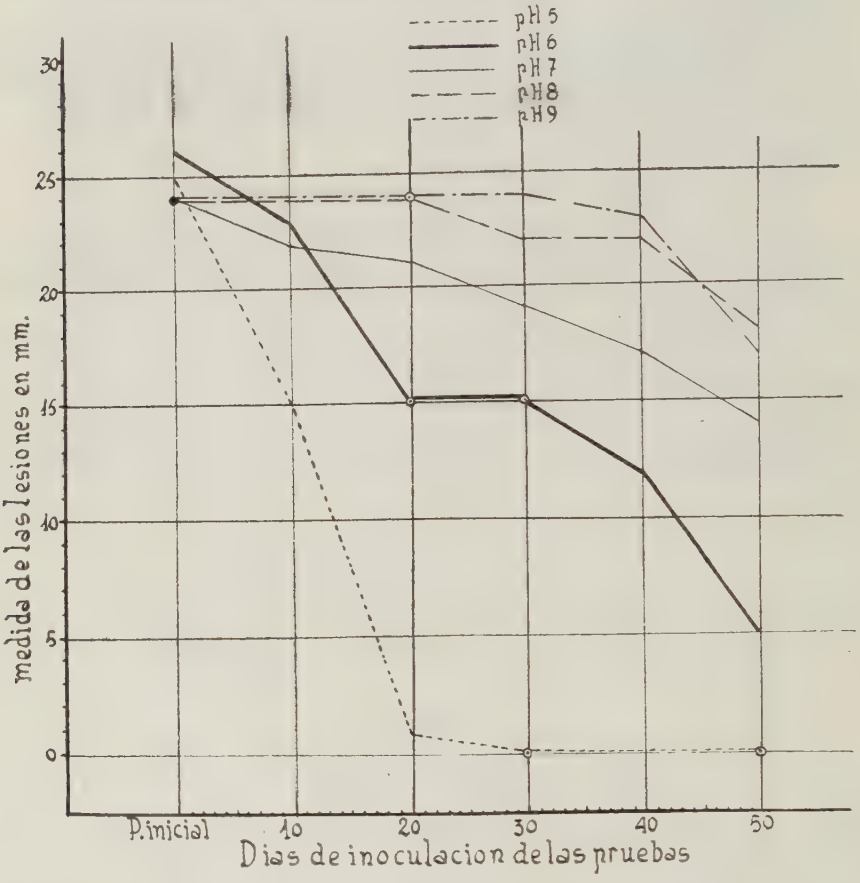


FIG. 22.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie B.

pH 6 Conserva bien la actividad hasta los 30 días; a los 40 es muy poco activo y a los 50 nulo.

pH 7 Conserva toda su actividad hasta los 30 días, a los 40 es casi igual y a los 50 produce lesiones muy considerables.

pH 8 Conserva la actividad inicial hasta los 20 días, desciende algo a los 30, sigue igual a los 40 y es nula a los 50.

pH 9 Conserva toda la actividad inicial hasta los 20 días, es activo a los 30 y completamente nulo a los 40.

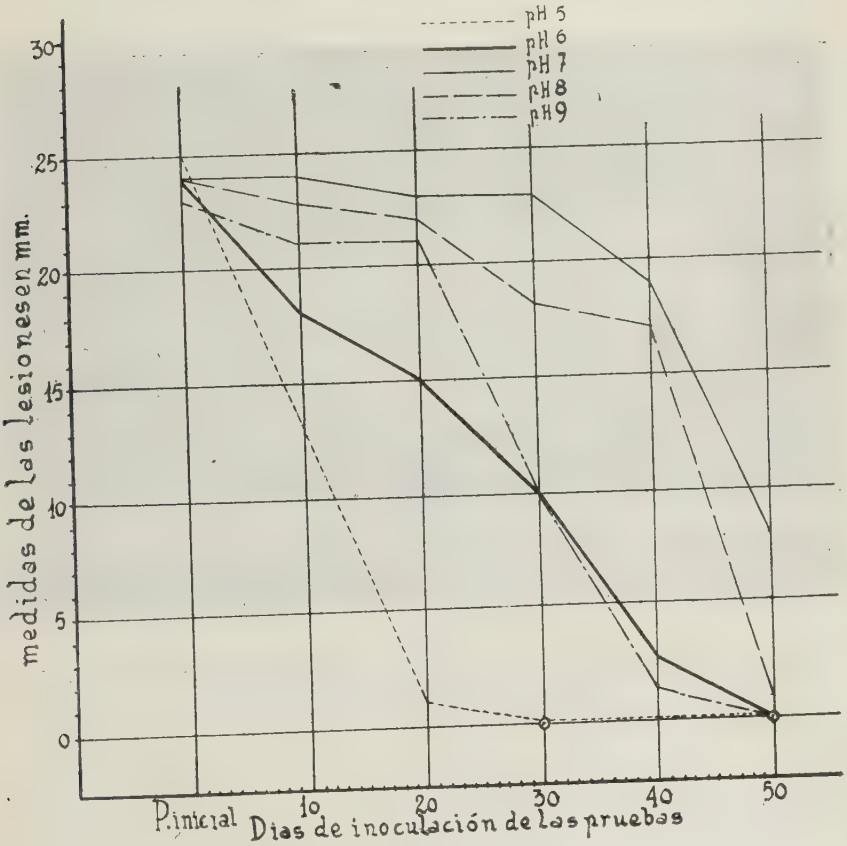


FIG. 23.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie E.

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (B) y (E).

pH 5 (B) No activo a los 30 días.
pH 5 (E) No activo a los 30 días.

pH 6 (B) No activo a los 50 días.
pH 6 (E) No activo a los 50 días.

pH 7 (B) Buena actividad a los 50 días.
pH 7 (E) Muy activo a los 50 días.

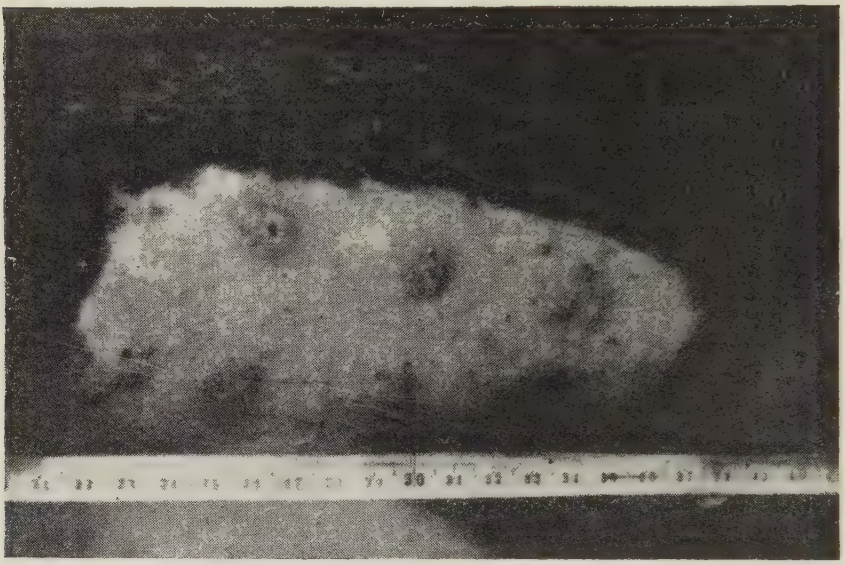


FIG. 24.
Pruebas de actividad a los 40 días de las suspensiones de las Series B y E. a pH 7 (Observación al 5.º día).

pH 8 (B) Muy activo a los 50 días.
pH 8 (E) No activo a los 50 días.

pH 9 (B) Buena actividad a los 50 días.
pH 9 (E) No activo a los 40 días.

Resumen.

Soluciones de la Serie (B).—De poca y regular actividad en los pH 5 y 6, mantiene buena actividad en el pH 7, da lesiones mayores en el pH 8 a los 50 días, y conserva parecida actividad en el pH 9 al final de la experiencia.

Soluciones de la Serie (E).—De nula actividad a los 30 días en el pH 5, y en el pH 6 a los 50 días, se mantiene muy activa en el pH 7 y resulta inactiva a los 50 días en el pH 8 y a los 40 en el pH 9.

OBTENCION DEL MATERIAL PARA LAS EXPERIENCIAS NUMEROS V, VI y VII

Para estas tres experiencias se inocularon en distintas fechas varias series de huevos con la cepa de virus testicular, formando con sus embriones tres lotes de pulpa: una, integrada por alantoides; otra, por vísceras y cerebros, y la tercera, por los cuerpos de los embriones sin extremidades, vísceras ni cerebros.

Cada uno de estos lotes fué triturado en la forma ya indicada en las experiencias anteriores, y después de tres meses de almacenamiento en nevera a —20° C., descongelados lentamente, triturados en morteros y suspendidos los triturados al 1/10 en las soluciones de glicerinas fosfatadas, Serie (B), y de veronal sódico, Serie (E).

Los tubos de ensayo (vidrio neutro) conteniendo las suspensiones a los distintos pH, fueron sometidos al mismo ambiente de temperatura y luz que todas las experiencias anteriores y diluídas las suspensiones en solución salina hasta 1/1.000.000, antes de su inoculación.

Resultados de la experiencia núm. V. Lote de membranas alantoideas.

Soluciones de glicerinas fosfatadas. Serie (B).

pH 5 Pierde mucho a los 10 días, no varía a los 20, a los 30 ha perdido casi toda su actividad y es nulo a los 50.

pH 6 Pierde a los 10 días, sigue casi igual a los 20, baja de nuevo a los 30 y es nulo a los 50.

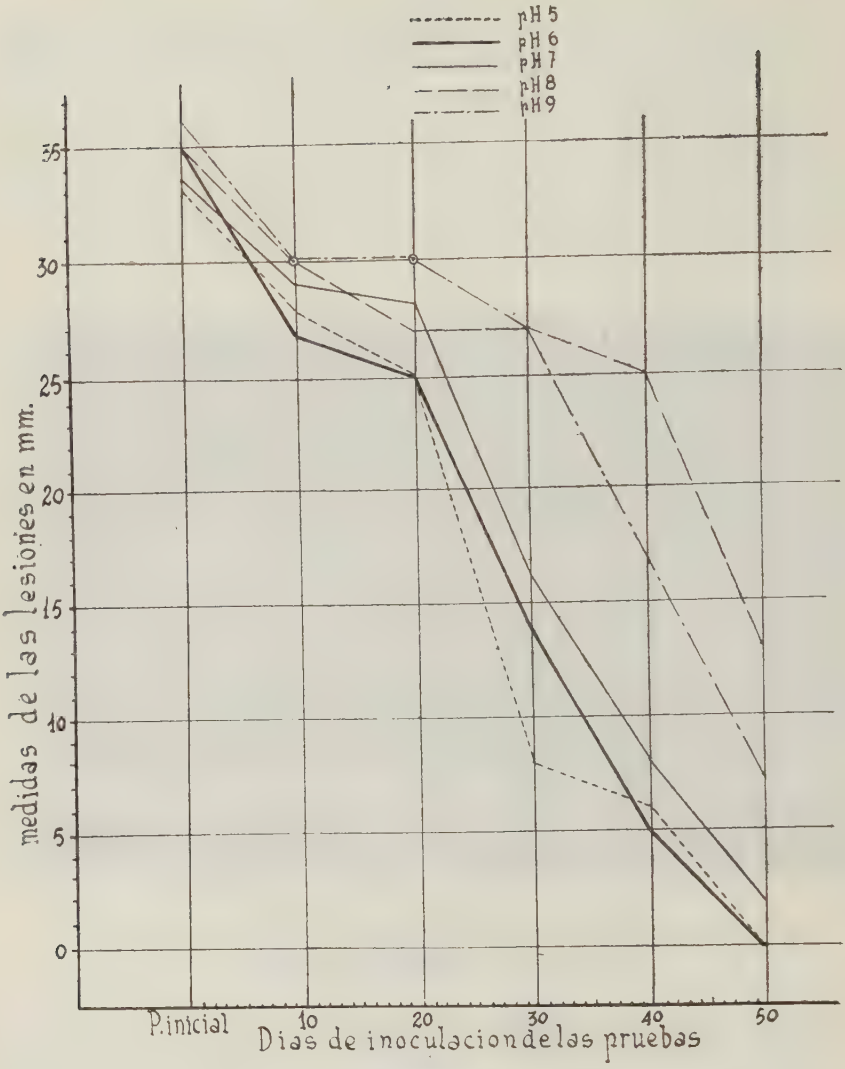


Fig. 25.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie B.

pH 7 Con lesiones mayores que los anteriores, sigue la misma pauta, y a los 50 días es todavía activo.
pH 8 Desciende lentamente hasta los 40 días y a los 50 es todavía muy activo.
pH 9 Con lesiones parecidas a los anteriores hasta los 30 días, a los 40 son menores y a los 50 es todavía activo.

Soluciones de veronal sódico. Serie (E).

pH 5 Pierde muy poco a los 10 días, desciende regularmente a los 20 y 30, baja mucho a los 40 y se conserva casi igual a los 50.
pH 6 Conserva casi toda su actividad inicial a los 10 días, desciende regularmente hasta los 50, en que todavía es activo.
pH 7 Por el estilo que el anterior, pero más activo.
pH 8 Conserva toda la actividad hasta los 20 días, empieza a descender a los 30 y a los 50 es muy activo.
pH 9 Bien conservado hasta los 10 días, empieza a descender lentamente hasta los 50, en que se muestra activo, aunque menos que los anteriores.

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (B) y (E).

pH 5 (B) Actividad nula a los 50 días.
pH 5 (E) Activo a los 50 días al 1/1.000.

pH 6 (B) Actividad nula a los 50 días.
pH 6 (E) Activo a los 50 días al 1/10.000.

pH 7 (B) Muy poco activo a los 50 días al 1/100.
pH 7 (E) Activo a los 50 días al 1/10.000.

pH 8 (B) Activo a los 50 días al 1/10.000.
pH 8 (E) Activo a los 50 días al 1/10.000.

pH 9 (B) Activo a los 50 días al 1/1.000.
pH 9 (E) Activo a los 50 días al 1/1.000.

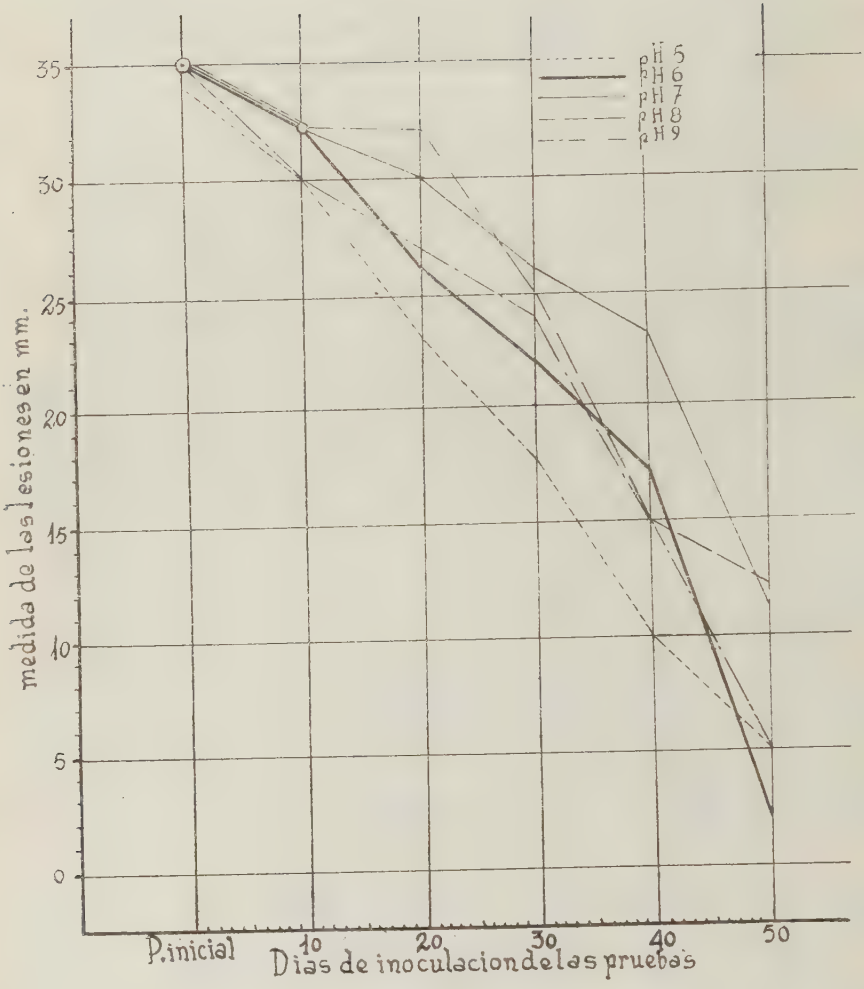


FIG. 26.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie E.

Resumen.

Solución de la Serie (B).—De nula actividad en los pH 5 y 6 a los 50 días y muy poca en los mismos días en el pH 7, se conserva activo en el pH 8 y de buena actividad en el pH 9 hasta el final de la experiencia.

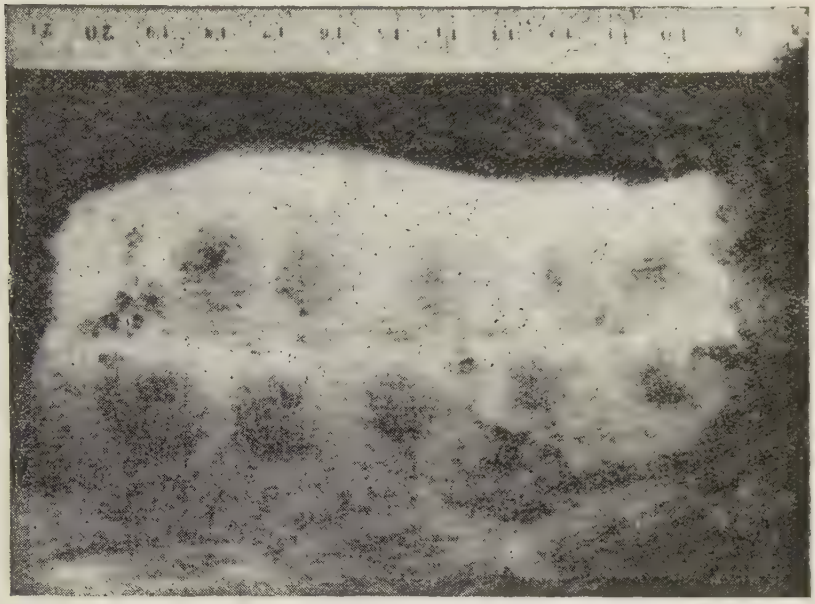


FIG. 27.
Pruebas de actividad inicial de las suspensiones de las Series B y E.
a pH 9 (Observación al 5.º día).

Soluciones de la Serie (E).—Todos los pH muestran su actividad hasta el final de la experiencia. Los pH 5 y 9 hasta la dilución 1/1.000, y los pH 6, 7 y 8 hasta la dilución 1/10.000.

Resultados de la experiencia núm. VI.
Lotes de vísceras y cerebros.

Soluciones de glicerinas fosfatadas. Serie (B).

pH 5 De buena actividad inicial, pierde a los 10 días y es nulo a los 20.
pH 6 Desciende rápidamente y es nulo a los 40 días.

pH 7 Pierde mucho en los 10 primeros días y sigue bajando hasta los 40, en que todavía es activo.

pH 8 No pierde nada hasta los 20 días, descendiendo poco a poco para ser algo más activo que el pH anterior a los 40.

pH 9 Desciende lentamente hasta los 30 días; a los 40 es nulo.

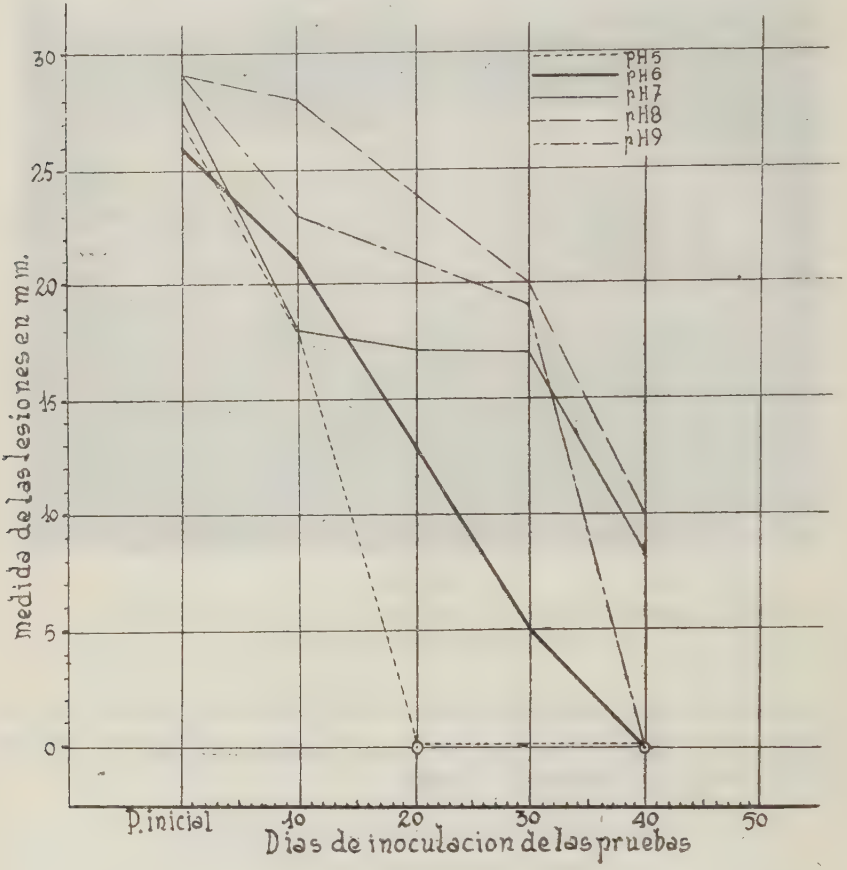


FIG 28.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie B.

Soluciones de veronal sódico. Serie (E).

pH 5 De muy poca actividad a los 10 días; a los 20 es nulo.

pH 6 Se conserva bien hasta los 10 días, desciende rápidamente su actividad a los 20, y a los 40 es completamente nulo.

pH 7 Baja de actividad a los 10 días, se conserva sin variar a los 20 y es completamente nulo a los 30 días.

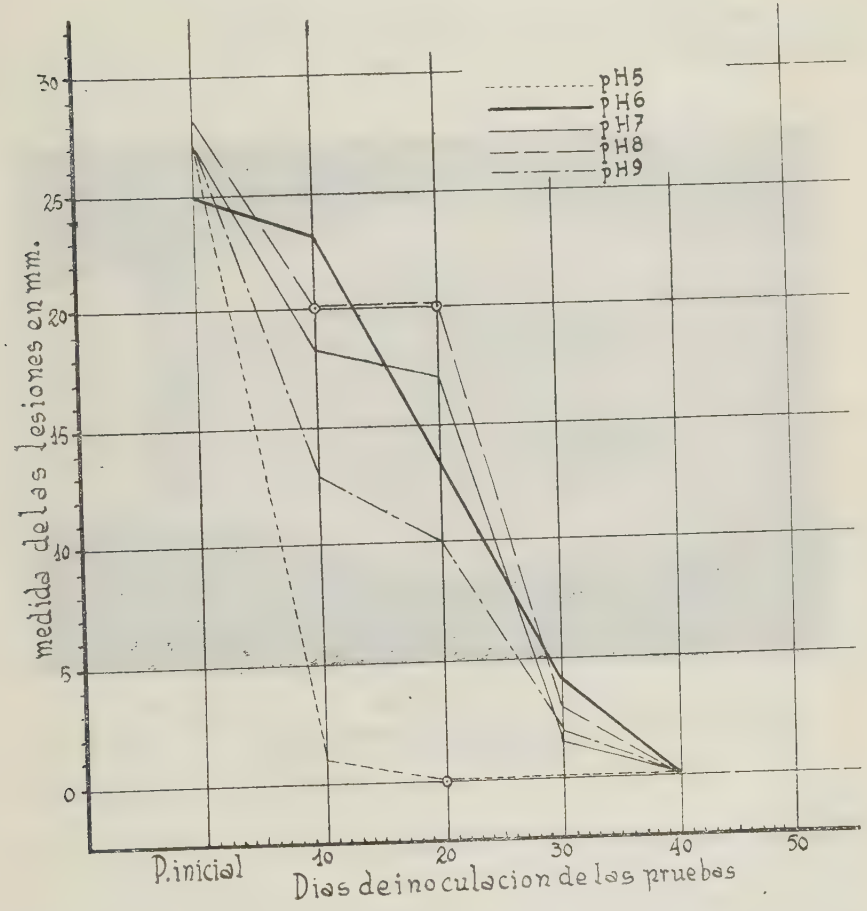


FIG. 29.

Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie E

pH 8 Desciende su actividad a los 10 días, se conserva igual a los 20 y baja rápidamente a los 30, para ser nulo a los 40 días.

pH 9 Va descendiendo de actividad rápidamente y a los 40 días es completamente nulo.

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (B) y (E).

pH 5 (B) Actividad nula a los 20 días.

pH 5 (E) Actividad nula a los 20 días.

FIG. 30.
Pruebas de actividad inicial de las suspensiones de las Series B y E. a pH 8 (Observación al 5.º día).

pH 6 (B) Actividad nula a los 40 días.

pH 6 (E) Actividad nula a los 40 días.

pH 7 (B) Activo a los 40 días.

pH 7 (E) Actividad nula a los 30 días.

pH 8 (B) Activo a los 40 días.
pH 8 (E) Actividad nula a los 40 días.

pH 9 (B) Actividad nula a los 40 días.
pH 9 (E) Actividad nula a los 40 días.

Resumen.

Soluciones de la Serie (B).—De nula actividad a los 20 días en el pH 5, e igualmente en el pH 6 a los 40, se mantiene activo a los 40 en los pH 7, 8 y 9.

Soluciones de la Serie (E).—De actividad nula a los 20 días en el pH 5, e igualmente nula a los 40 en el pH 6, pierde su actividad a los 30 en el pH 7 y a los 40 en los pH 8 y 9.

Resultados de la experiencia núm. VII.
Lote de cuerpos de embriones.

Soluciones de glicerinas fosfatadas. Serie (B).

pH 5 De gran actividad inicial, pierde rápidamente a los 10 días y es nulo a los 20.
pH 6 Igual que el anterior, aunque algo más activo a los 10 días.
pH 7 Con buena actividad a los 10 días, a los 20 la conserva todavía, siendo mínima a los 30 y nulo a los 40.
pH 8 Va descendiendo de actividad a los 10 y 20 días; a los 30 es todavía activo y a los 40 inactivo.
pH 9 Conserva toda su actividad a los 10 días, va descendiendo hasta los 30, en que todavía es activo, y a los 40 es inactivo.

Soluciones de veronal sódico. Serie (E).

pH 5 Desciende dápidamente de actividad a los 10 días, y a los 20 es ya nulo.
pH 6 Pierde rápidamente de actividad para ser nulo a los 30 días.
pH 7 Conserva toda su actividad a los 10 días, desciende a los 20 y a los 30 es nulo.

pH 8 Baja de actividad a los 10 días, se conserva casi igual a los 20, es casi nulo a los 30 y a los 40 es totalmente nulo.

pH 9 Va descendiendo de actividad hasta los 20 días y a los 30 es nulo.

Examen comparativo de los pH de las soluciones de las Series (B) y (E).

pH 5 (B) Actividad nula a los 20 días.

pH 5 (E) Actividad nula a los 20 días.

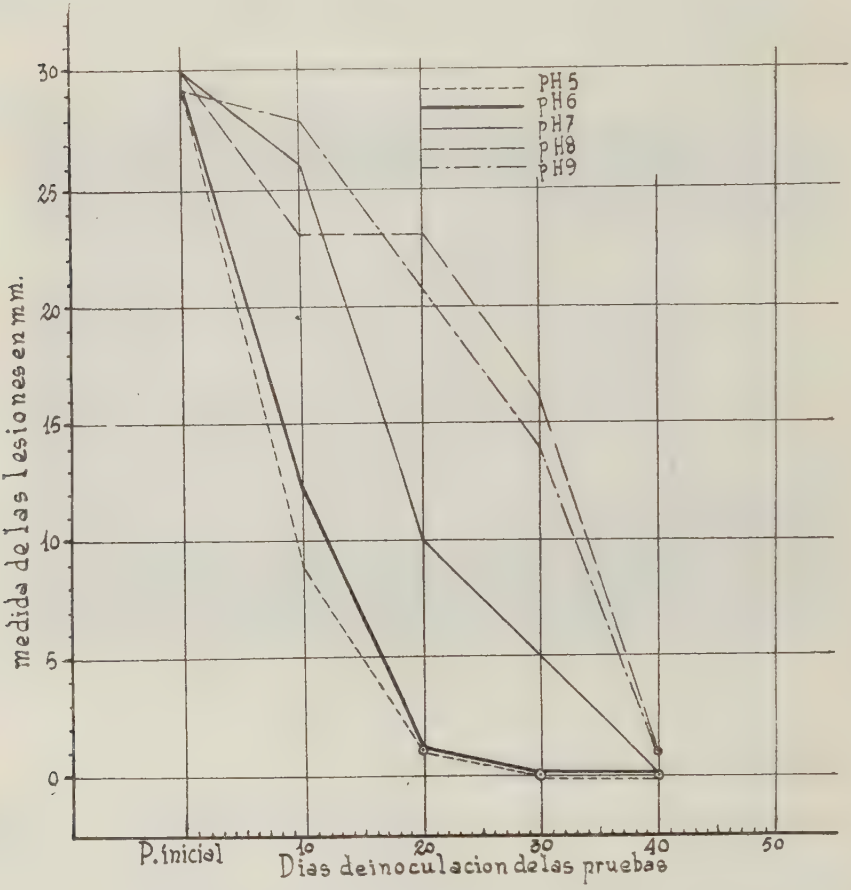


FIG. 31.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie B.

pH 6 (B) Actividad nula a los 20 días.
pH 6 (E) Actividad nula a los 30 días.
pH 7 (B) Actividad nula a los 40 días.
pH 7 (E) Actividad nula a los 30 días.
pH 8 (B) Actividad nula a los 40 días.
pH 8 (E) Actividad nula a los 40 días.
pH 9 (B) Actividad nula a los 40 días.
pH 9 (E) Actividad nula a los 30 días.

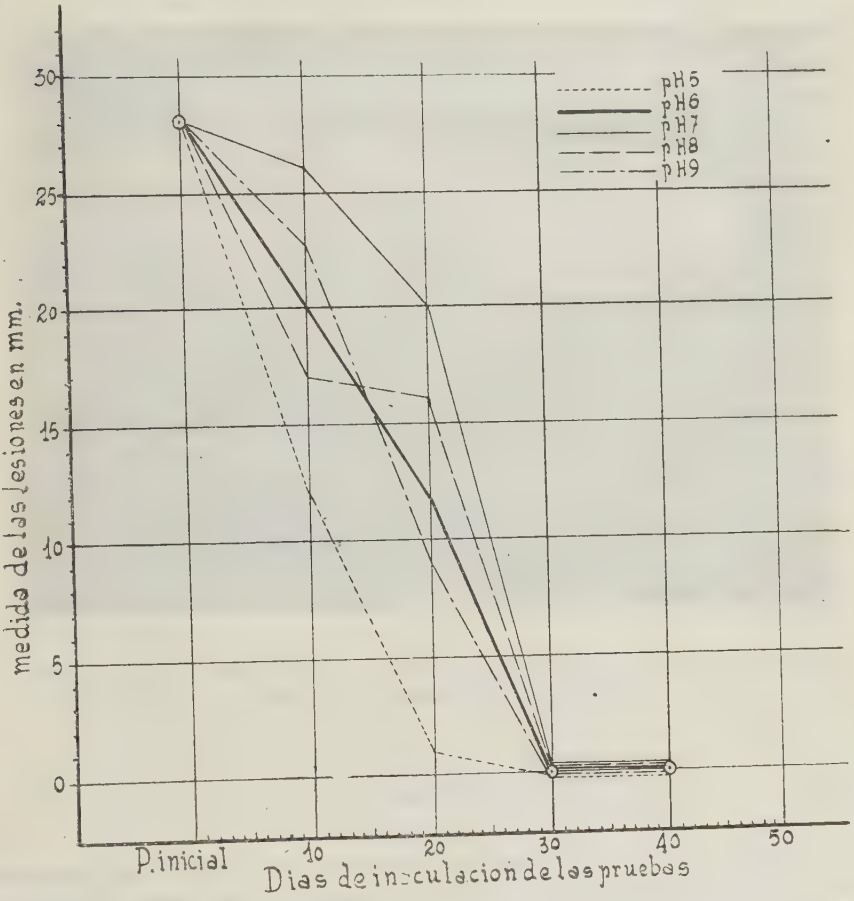


FIG. 32.
Gráficas de las pruebas de actividad de la suspensión de embriones al 10^{-2} de la Serie E.

Resumen.

Soluciones de la Serie (B).—De actividad nula a los 20 días en los pH 5 y 6 es igualmente nula a los 40 en los pH 7, 8 y 9.

Soluciones de la Serie (E).—De actividad nula a los 20 días en el pH 5, e igualmente nula a los 30 en los pH 6 y 7, es inactiva a los 40 en el pH 8 y a los 30 en el 9.

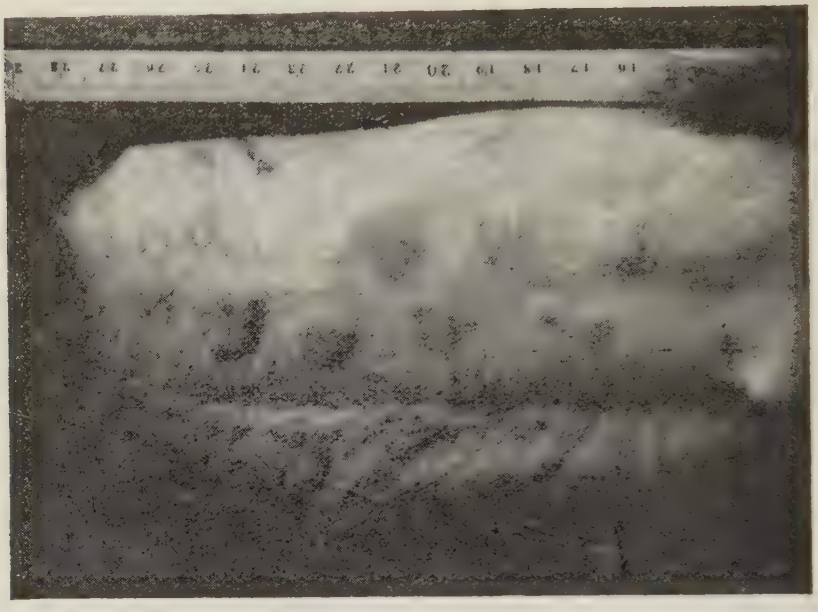


FIG. 33.
Pruebas de actividad a los 10 días de las suspensiones de las Series B y E, a pH 7 (Observación al 5.º día).

RESUMEN

Con este trabajo nos propusimos estudiar varias sustancias químicas que, siendo antisépticos débiles y no atacando al virus vacunal embrionario, sirviesen como conservadores del mismo y al mismo tiempo evitasen cualquier contaminación accidental: asimismo nos interesaba es-

tudiar el pH óptimo para la conservación del virus a que había que ajustar estas soluciones antisépticas.

Estas sustancias, que fueron estudiadas en soluciones, han sido las siguientes:

Glicerina diluída al 50 por 100 en soluciones tampón de fosfatos (Serie A), y en soluciones tampón de fosfatos a doble concentración (Serie B).

Cisteína diluída al 1/1.000 en solución salina-agar (Serie C).

Veronal-veronal sódico (Serie D).

Veronal sódico acetato sódico (Serie E).

Para estudiar el pH óptimo dividimos cada una de las series anteriores en cinco partes, que ajustamos a los pH 5, 6, 7, 8 y 9.

La duración de las experiencias dentro de cada serie y para cada pH ha sido de 50 días.

Como el virus vacunal de pulpa de ternera es bastante resistente, hicimos nuestras experiencias con virus vacunal embrionario menos resistente, y lo conservamos a temperatura ambiente (de 18° a 22° C.), con lo que el tiempo de duración de cada experiencia ha sido suficiente para ver el poder conservador de las soluciones de las sustancias químicas y el del pH.

Para obtener el virus vacunal embrionario, partimos de un filtrado vacunal muy rico en virus (obtenido de pulpa de ternera, según técnica de Monteiro y Godinho) liofilizado.

Con este filtrado al 1/10 inoculamos dos lotes de huevos de gallina fecundados de 12 días de incubación (técnica de Cox, lotes 1 y 2); con este mismo filtrado inoculamos en testículo de conejo adulto para obtener un virus testicular lapino muy activo, con el que inoculamos otros tres lotes más de huevos de gallina (3, 4 y 5) de los mismos días de incubación que los anteriores.

Así, hemos obtenido cinco lotes de huevos de gallina inoculados de los lotes núms. 1, 2, 3 y 4; hicimos las experiencias núms. I, II, III y IV, recogiendo de cada uno las membranas alantoides y los embriones desprovistos de las cabezas y extremidades; fueron triturados y suspendidos al 1/10 en las series correspondientes, que para las experiencias números I y II fueron las A, C y D, y para las experiencias núms. III y IV las Series B y E.

Con el lote núm. 5 hicimos tres experiencias: la V, de membranas alantoides; la VI, de vísceras y cerebros, y la VII, de los cuerpos de

los embriones sin cabezas, vísceras ni extremidades; hechos los triturados, se suspendieron al 1/10 en las soluciones de las series B y E.

Todas las suspensiones se recogieron y se conservaron en tubos de ensayo estériles.

Las pruebas de actividad inicial y las que se hicieron cada diez días (según la técnica de Groth) se hicieron hasta la quinta prueba (a los 50 días). La lectura (medida en milímetros) de las lesiones producidas por los virus se hizo al quinto día de ser inoculados los conejos.

En las experiencias núms. I y II las inoculaciones se hicieron con suspensiones de 1/100 al 1/100.000. En las núms. III, IV, V, VI y VII las suspensiones fueron del 1/100 al 1/1.000.000.

En nuestras experiencias hemos utilizado 540 huevos fecundados, de los que un 50 por 100 aproximadamente no se han aprovechado bien por haber muerto antes de los 12 días de incubación o antes del cuarto posterior a la inoculación, que es cuando la riqueza en virus de los huevos es mayor. Para la inoculación en conejos se han empleado 225, que resultaron con la piel blanca, y tuvimos que desechar un 35 por 100 aproximadamente de la cifra anterior, por presentarla muy pigmentada y no servir para nuestras experiencias.

En el cuadro adjunto hemos hecho un esquema de las experiencias que hemos realizado, y en él se ven los títulos finales de las suspensiones de los distintos lotes estudiados.

Resumen de las conclusiones que se desprenden de nuestras experiencias:

1.ª Todas las soluciones de sustancias químicas que pusimos en contacto prolongado con el virus vacunal demostraron sus buenas condiciones conservadoras.

2.ª Haciendo una escala aproximada de las condiciones conservadoras, tenemos que: la primera es la Serie B (glicerinas fosfatadas a doble concentración); segunda, Serie A (glicerinas fosfatadas); tercera, Serie C (cisteína); cuarta, Serie E (veronal sódico acetato sódico), y, finalmente, Serie D (veronal-veronal sódico).

3.ª La influencia del pH en la conservación del virus vacunal se ha puesto de manifiesto de un modo evidente en todas las series de diluciones utilizadas en las experiencias.

4.ª El pH 5 fué indiscutiblemente el más desfavorable de todos, seguido en la mayoría de las experiencias del pH 6, si bien excepcional-

Virus vacunal. (de pulpa de ternera). Tít.: 5 mm. 1/100000.	Inoculación en embriones.	Lote 1. Tít. 7 mm. 1/100.000.	Exp. n.º I.	Susp. en soluciones Serie A (Glicerinas fosfatadas). » » » Serie C (Cisteína). » » » Serie D (Veronal-veronal sódico).
	Inoculación en embriones.	Lote 2. Tít. 10 mm. 1/100.000	Exp. n.º II.	Susp. en soluciones Serie A (Glicerinas fosfatadas). » » » Serie C (Cisteína). » » » Serie D (Veronal-veronal sódico).
	Inoculación en embriones.	Lote 3. Tít. 14 mm. 1/1.000.000.	Exp. n.º III.	Susp. en soluciones Serie B (Glicerinas fosfatadas a doble concentración). » » » Serie E (Veronal sódico).
	Inoculación en embriones.	Lote 4. Tít. 10 mm. 1/1.000.000.	Exp. n.º IV.	Susp. en soluciones Serie B (Glicerinas fosfatadas a doble concentración). » » » Serie E (Veronal sódico).
			Exp. n.º V. Tít. 17 m m. 1/1.000.000.	Susp. en soluciones Serie B (Glicerinas fosfatadas a doble concentración). » » » Serie E (Veronal sódico).
	Virus testicular. Tít. 7 mm. 1/1.000.000. — Inoculación en testículo conejo.	Lote 5.	Exp. n.º VI. Tít. 10 mm. 1/1.000.000.	Susp. en soluciones Serie B (Glicerinas fosfatadas a doble concentración). » » » Serie E (Veronal sódico).
			Exp. n.º VII. Tít. 9 mm. 1/1.000.000.	Susp. en soluciones Serie B (Glicerinas fosfatadas a doble concentración). » » » Serie E (Veronal sódico).

mente este último se mostró muy activo en las experiencias núm. I, Serie C, y en la núm. III, Serie E.

5.ª Los pH centrales 7 y 8 fueron los mejores en casi todas las experiencias, manifestándose por el tamaño de las lesiones y conservación de la actividad del virus vacunal hasta el término de las mismas.

6.ª El pH 9 fué el más irregular de todos, si bien en general ha seguido de cerca a los anteriores.

En nuestras experiencias, los pH 7 y 8 dieron resultados próximos seguidos del 9.

7.ª La zona ácida fué, en general, más desfavorable que la zona alcalina.

8.ª Los lotes núms. I y II obtenidos de huevos inoculados con filtrado de pulpa de ternera, fueron menos activos que los restantes, inoculados con virus vacunal testicular.

9.ª De todos ellos, el lote núm. V (alantoides) fué el más rico en virus y de mayor resistencia, ya que dió lugar a grandes lesiones con las soluciones de las series B y E hasta el final de la experiencia (50 días).

10. El tiempo de conservación de los lotes a —20° C. no ha influído notablemente sobre la actividad del virus vacunal, pues si bien el lote número I (algo menos activo que el núm. II) estuvo seis meses conservado hasta que se empezó la experiencia, la pulpa del lote núm. IV se almacenó ya triturada a —20° C. durante cuatro meses, a pesar de lo cual resultó uno de los más activos.

11. Para el virus vacunal utilizado en nuestras experiencias, las soluciones de la Serie B, ajustadas a un pH intermedio entre 7 y 8, son las que han reunido las condiciones óptimas para su más perfecta y prolongada actividad.

Sirvan estas líneas para manifestar mi agradecimiento al director del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología del C. S. I. C. y catedrático de Bacteriología y Protozoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid, don Arnaldo Socías Amorós.

Asimismo, expreso mi reconocimiento al doctor don Eduardo Gallardo Martínez, jefe de la Sección de Virus de dicho Instituto, porque a él debo el conocimiento de las técnicas utilizadas, y porque sin su dirección y ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Hago también constar mi gratitud al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ya que como becario de este Organismo he realizado mi labor.

RESUMEN

En este trabajo el autor estudia la acción de varias sustancias químicas que siendo antisépticas débiles y no atacando al virus vacunal embrionario, sirviesen como conservadoras y al mismo tiempo evitasen cualquier contaminación accidental.

Asimismo se ha estudiado el pH óptimo para la conservación de dicho virus, a que había que ajustar estas soluciones.

SUMMARY

In the present communication the author studies the action of several chemicals, which are weak antiseptics and they de not attack to the embrionary virus vaccine. These chemicals were choosen in order to protect it and to avoid contamination.

In addition the optimum pH for its conservation has been studied.

BIBLIOGRAFIA

(1) Levaditi: Masson y Cie. p. 62, 1922.
(2) Olitsky y Cox: Science, n.º 2085, p. 566, 1934.
(3) Sabin, Olitsky y Cox: J. exp. Med. 63.877, 1936.
(4) Armstrong y Harrison: Public Health Rep. 50,725, 1935; 51,203, 1936.
(5) Schultz y Gebhardt: Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 34,133, 1936.
(6) Levaditi y Harvier: Ann. In. Pasteur, 34,911, 1920.
(7) Levaditi, Harvier y Nicolau: Annales Pasteur, 36,1, 1922.
(8) Mariani: Arch. f dermatol. u Syph. 147,259, 1924.
(9) Bruni: Eziolog. dell'Herpes, Tipoger, cooper, Pavie, 1923.
(10) Homutov: Bul. Acad. Veterinaire, 8,492, 1935.
(11) Yaoi y Kasai: The Japanese Journ. exp. Med., 8,499, 1930.
(12) Stanley: Science, 81.2113, 1935
(13) Kraus: Zeitschr. f. Hyg. 34,31, 1900.
(14) Eisler: Zbl. f. Bakt. 45,71, 1908
(15) Russ: Arch. f. Hyg, 59,306, 1906.
(16) Neufeld y Prowazek: Arb. Kaiserl. Gesundheits, 25,504, 1904.

(17) LANDSTEINER, LEVADITI y PASTIA: Ann. Pasteur, 25,804, 1911.
(18) WIESNER y LEINER: Stud über die Heine-Medinsche Krank, Leipzig, Deuticke, édi, p. 168.
(19) LEVADITI y HARVIER: C. R. Soc. de Biol. 84,388, 1921.
(20) NOGUCHI: The Jour. of Exp. Med. 21,539, 1915.
(21) HAMMON y REEVES: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 60,84, 1945.
(22) MULLER: Instituto Vacunal de Berlín, 1886.
(23) LÉPIN: Levaditi y Lépin, t. II, p. 1061.
(24) ZINSSER y TANG: Jour, of Inmunology, 17,343, 1929.
(25) Mc. KINNON: Trans. A. S. C., V.º section, p. 259, 1932.
(26) ZINSER y SEASTONE: Jour. of Immunol., 18,1, 1930.
(27) YAOI y KASAI: The Japan Med. Word 6,207, 1926.
(28) PYL: Hoppe-Seyler's Zeit of physiol. Chem., 226,18, 1934.
(29) MONTEIRO y GODINHO: Mem. Inst. Butamtam, 5, 1930.
(30) GROTH: Ergeb. Hyg: Bakt., 10,335, 1929.
(31) ILLERA y GALLARDO: Arch. Inst. N. de Higiene Alfonso XIII, t. 1, 1922.
(32) GALLARDO: Arch. Inst. Alfonso XIII, 1924.
(33) GALLARDO: Revista Sanidad e Higiene Pública, julio-agosto, 1952.
(34) GAY y THOMPSON: Proc. exp. Biol. and Med., 26,556, 1929.
(35) BARYKIN, KOMPANEETZ y BOTSCHOROWA: Mikobiol, Z., 15,163, 1935.
(36) COX: Pub. H. Rep., 53,2441, 1938.
(37) COX: Science, 94,339, 1941.
(38) CALMETTE y GUERIN: Ann. Inst. Pasteur, p. 161, 1901.
(39) KÜSTER y THIEL: Tablas logarítmicas. ed. Española. 1943.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE MICOLOGIA

NOTA SOBRE ALGUNAS MODIFICACIONES INTRODUCIDAS EN LA TINCION DE NUCLEOS DE MICROORGANISMOS

POR
CARLOS RAMÍREZ GÓMEZ

Al emplear las técnicas de tinción nuclear en los microorganismos, tales como levaduras y hongos filamentosos, encontramos el gran inconveniente de la contracción de las células, debida a los reactivos empleados, a la preparación de frotis sobre portas y, finalmente, a la deshidratación, necesaria para el montaje en bálsamo.

Todas estas manipulaciones dejan a las células del microorganismo en un estado bastante diferente del que tienen en vivo. La estructura del citoplasma desaparece; las gotas de grasa son eliminadas por los disolventes empleados al deshidratar; las vacuolas no son visibles con claridad; los núcleos disminuyen mucho de tamaño, haciendo más difícil su observación. Por todo ello, la posición relativa de los núcleos con respecto a los distintos elementos celulares, en las células tratadas por los procedimientos corrientes empleados en las tinciones, no podía hacerse directamente al desaparecer dichos elementos.

Creímos, por tanto, que al evitar la mayor parte de estas manipulaciones llegaríamos a aproximar la semejanza de la estructura de los organismos teñidos con la estructura de los mismos en vivo, lo que hemos logrado por las técnicas que a continuación describimos.

Hemos empleado en las tinciones la coloración nuclear de Giemsa (Robinow) (1), que es la que nos ha dado los mejores resultados.

Según que operemos con levaduras u hongos filamentosos, empleamos distinta técnica.

1) *Fijación.*

a) *En el caso de las levaduras.*—Suspendemos el microorganismo en la solución fijadora: en este caso, iodo-formol-acética, durante veinticuatro horas.

b) *En el caso de hongos filamentosos.*—Con unas agujas finas se dilacera finamente el micelio y se suspende en la solución fijadora durante veinticuatro horas, produciendo vacío con una trompa de agua, para que la solución penetre bien en la masa del micelio, al eliminar las burbujas de aire; para evitar que hierva la solución fijadora, se sumerge el recipiente, donde va la solución, en agua fría.

2) A las veinticuatro horas, en los dos casos, se centrifuga para eliminar el fijador.

3) Se lavan con agua corriente las células por tres veces, centrifugando después de cada lavado.

4) Se suspenden las células o el micelio en ClH normal y se hidroliza a 60° durante diez minutos.

5) Se detiene la hidrólisis vertiendo agua fría sobre la suspensión de ClH y se centrifuga para eliminar el ácido.

6) Se lava por tres veces con agua a pH 7, centrifugando después de cada lavado.

7) Se suspenden las células o el micelio en la solución de Giemsa preparada en el momento del empleo (una gota de colorante por centímetro cúbico de agua a pH 7), dejando actuar el colorante durante veintetreinta minutos.

8) *En el caso de las levaduras,* se centrifuga para eliminar el exceso de colorante y se montan las células en una gota de colorante, entre porta y cubre, parafinando los bordes del cubre, o cerrándolos con bálsamo del Canadá.

En el caso de hongos filamentosos, se pasan los micelios del colorante al porta, con un pincel fino, a una gota de agua a pH 7, previamente vertida sobre el porta. Se cubre y se bordean los bordes del cubre con parafina o bálsamo del Canadá.

Los resultados obtenidos son excelentes. El tamaño de las células casi no varía en los organismos teñidos por este método. En cambio, por deshidratación, el tamaño de las células quedaba reducido a menos de la mitad. Además, se pueden observar los núcleos con la posición relativa exacta que ocupan en las células con respecto a las demás estructuras celulares, que no desaparecen, como ocurre en las preparaciones deshidratadas.

BIBLIOGRAFIA

(1) A. Socías y C. Ramírez. Estudio cariológico de algunas levaduras ascosporógenas y anascosporógenas. Microbiología Española, vol. 8, núm. 4: 389-417, 1955.

C. S. I. C.

INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

SECCION DE QUIMICA MICROBIANA

FORMACION DE 6-METIL ACIDO SALICILICO POR EL *PENICILLIUM PATULUM* BAINIER

POR

R. LAHOZ y DOMINGO RODRÍGUEZ

INTRODUCCION

Un considerable número de estudios bioquímicos se han llevado a cabo sobre la fermentación del *Penicillium patulum* Bainier, habiendo conducido al aislamiento en estado cristalino de diversos productos metabólicos. Casi invariablemente todas estas sustancias se han originado en el crecimiento del microorganismo que nos ocupa sobre medios de cultivo químicamente definidos, como son los de Raulin-Thom y Czapek-Dox.

En el siguiente cuadro se hallan agrupadas las sustancias descritas en la literatura como productos del metabolismo del *Penicillium patulum* Bainier (Sin.: *P. urticae, P. flexuosum*).

Acido fúlvico	(1)
Patulina	(2)
Alcohol gentisílico y patulina	(3)
Sólido cristalizado en agujas de color violeta que funde a 86-89° C.	(4)
Griseofulvina	(5)
Aldehido gentísico y ácido gentísico	(6)

En el presente trabajo hemos aislado en estado puro y caracterizado el 6-metil ácido salicílico junto con el antibiótico patulina, ambos formados en los procesos metabólicos del *Penicillium patulum* Bainier. El 6-metil ácido salicílico fué aislado por vez primera por Anslow y Raistrick en 1931 (7), quienes además establecieron su constitución molecu-

lar. Dichos investigadores lo extrajeron de los líquidos de cultivo del *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx.

A. Grosser y W. Friedrich (1948) (8) obtuvieron e identificaron el 6-metil ácido salicílico de los líquidos donde se había desarrollado el *Penicillium claviforme*.

El moho cuya bioquímica es objeto de estudio en este trabajo fué aislado el 23 de enero de 1955 de una muestra de tierra de labor procedente de Córdoba, que nos fué facilitada por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal del C. S. I. C. La identificación de este microorganismo corrió a cargo del doctor C. Ramírez, de la Sección de Micología del Instituto «Jaime Ferrán». Posteriormente, el «Central bureau voor Schimmelcultures» de Baarn (Holanda) confirmó el diagnóstico emitido por el doctor C. Ramírez como *Penicillium patulum* Bainier, y figura con el número P-80 en nuestra colección del Instituto «Jaime Ferrán».

La atención prestada al estudio del líquido metabólico de este moho fué motivada por dos hechos observados en ensayos preliminares: 1.° Gran actividad antibacteriana frente al *B. coli;* y 2.° Reacción púrpura violeta con Cl_3Fe en muestras de líquido metabólico de diferentes períodos de incubación, generalmente de los seis a los ocho días.

PARTE EXPERIMENTAL

El moho fué resembrado en tubos estriados de agar-malta e incubado durante un período variable de tiempo, generalmente de diez a quince días, en el incubador a 25° C.

Se prepararon 8,750 litros de medio ordinario de Czapek-Dox de la composición siguiente:

Glucosa	50	gr.
NO_3Na	2	gr.
PO_4H_2K	1	gr.
ClK...	0,5	gr.
$SO_4Mg.7H_2O$	0,5	gr.
$SO_4Fe.7H_2O$	0,01	gr.
Agua destilada	1	lt.

y se distrubuyeron en matraces de erlenmeyer de un litro de capacidad, conteniendo cada uno 350 c. c. de medio. A continuación se esterilizaron

a vapor fluyente tres días consecutivos durante media hora cada día. Se sembraron con una suspensión de esporas del moho (obtenida a partir de los cultivos del moho en agar-malta) en agua destilada, y se incubaron en la oscuridad durante quince días a 24° C.

A las cuarenta y ocho horas de iniciada la incubación se observa la formación de una fina gasa de micelio, que a los tres o cuatro días se extiende, ocupando toda la superficie del medio. Esta, al principio de un color grisáceo con manchas blancas, va blanqueando en el transcurso de los días para adquirir una superficie casi totalmente blanca a los cinco o seis días, a la vez que toda la superficie aparece cubierta de abundante micelio. Transcurrido este tiempo, la superficie de la masa miceliana adquiere un color verde azulado con apariencia aterciopelada, mientras la mata de micelio aparece con arrugas o surcos más o menos profundos. A pesar de operarse siempre en las mismas condiciones, no siempre se siguen en el mismo orden las fases coloreadas de la masa miceliar, pues operando con otros lotes se observó que la fase blanca aparecida a los cinco a seis días, anteriormente descrita, sustituía a la fase verde azulada, manteniéndose ésta durante gran parte del período de incubación.

Al final del período de incubación (quince días) los matraces fueron retirados del incubador y los micelios separados del líquido metabólico por filtración. El micelio fué lavado con agua destilada, escurrido, prensado y secado al aire a la temperatura ambiente.

Estudio del líquido metabólico.

El líquido metabólico (8 lt. aproximadamente) presentaba un color amarillento, tenía pH 5, 0,27 gr./100 c. c. de glucosa residual (determinada polarimétricamente) y una fuerte actividad antibacteriana contra el *B. coli* (N. C. T. C. 86).

A la vista de los resultados obtenidos en experimentos preliminares, se decidió emplear como método de extracción del antibiótico la adsorción con carbón activo. El volumen total del líquido metabólico, unos siete litros aproximadamente, se ajustó a pH 2 por adición de 18 c. c. de ClH concentrado. Al líquido acidificado se le añadió 35 gr. de carbón activo (5 gr./lt.) y se agitó mecánicamente durante una hora. Se separó

el carbón por filtración, y después de lavado con agua se desecó a la trompa, y finalmente a 37° C. en la estufa.

Como el líquido filtrado seguía manifestando actividad antibacteriana este tratamiento de adsorción con carbón activo se repitió hasta que el ensayo de antibiosis fué negativo, requiriendo para ello cuatro extracciones más. La solución metabólica después de la quinta extracción no producía signo de inhibición apreciable cuando se ensayó frente al *B. coli*.

El carbón activo procedente de las cinco extracciones (175 gr.), fué reunido y extendido sobre una bandeja y mantenido en la estufa a 37° durante varios días hasta su completa desecación. El carbón desecado fué distribuído en varias aparatos Soxhlet y se extrajo con éter, cambiando de cuando en cuando los matraces colectores hasta que tomada una muestra (2 c. c. del extracto etéreo y evaporado el disolvente sobre un vidrio de reloj no dejaba residuo. La operación duró cuatro días. Se reunieron todos los extractos etéreos parciales y después de filtrados se dejaron una noche sobre SO_4Na_2 anhidro. Filtrado y destilado el disolvente a presión reducida, se obtuvo un material siruposo de color marrón, parcialmente cristalizado. Los cristales consistían en rombos y agujas largas incoloras impregnadas por abundante material siruposo. El peso total del extracto fué de 6,64 gr.

Tratamiento del extracto etéreo.

Una pequeña porción del extracto etéreo (0,98 gr.) se colocó en un pequeño matraz erlenmeyer y se lavó durante unos minutos con éter de petróleo hirviente (p. e., 40-70°), en baño de maría. Separado el disolvente por decantación, depositó al enfriarse grandes cristales incoloros en forma de agujas. Los lavados con éter de petróleo se repitieron varias veces, empleando disolvente puro cada vez, y se continuaron hasta que el disolvente decantado y dejado enfriar no depositaba más cristales. Se reunieron los cristales de los distintos lavados junto con el disolvente, y se separaron por filtración, secándolos a la temperatura ambiente en el mismo embudo. Una determinación del punto de fusión de esta sustancia cruda dió 168-170° C. Por recristalización de éter de petróleo (p. e., 40-70°) se obtuvo para el punto de fusión 169-170° C.

La solución acuosa de esta sustancia producía con solución de Cl_3Fe

acuoso una intensa coloración violeta-púrpura, muy difícil de distinguir de la producida por el ácido salicílico con este mismo reactivo. Una pequeña cantidad de sustancia disuelta en agua produjo inmediatamente un abundante precipitado con unas gotas de agua de bromo. Se disolvía fácilmente en agua caliente y muy poco o nada en agua fría. En éter de petróleo era insoluble en frío, pero se disolvía al calentar, de donde cristalizaba por enfriamiento. Se disolvía fácilmente en éter y en cloroformo.

Ensayos para la investigación del nitrógeno, azufre y halógenos en la molécula de la sustancia, dieron negativo.

De estas propiedades y de su punto de fusión (169-170° C.) se llegó a la conclusión de que la sustancia aislada podría ser 6-metil ácido salicílico.

Se mezcló íntimamente una pequeña cantidad de la sustancia problema con unos pocos miligramos del producto auténtico, facilitado este último por el Departamento de Bioquímica de la «London School of Hygiene and Tropical Medicine», y se determinó el punto de fusión de la mezcla, obteniéndose el valor de 170° C. Otra determinación dió el valor 170,5° C. El peso total obtenido de 6-metil ácido salicílico, a partir de los 0,98 gr. de material crudo, fué de 0,28 gr.

Derivado acetilado.

0,3 gr. del producto cristalizado (p. f. 169-170°) se disolvieron en piridina (1 c. c.), y a esta solución le fué añadido 0,5 c. c. de anhídrido acético. El matracito conteniendo la mezcla fué tapado y mantenido en una estufa a 37° durante cuatro días. Transcurrido este tiempo, se añadieron a la mezcla 15 c. c. de agua destilada, teniendo el matraz sumergido en agua fría. La solución así diluída fué acidificada a pH próximo a 2 con ácido sulfúrico 2N y extraído con éter. Separada la capa etérea y evaporado el disolvente, se obtuvieron 0,3 gr. de material cristalizado. Este producto crudo así obtenido, por disolución en benceno hirviente, depositó por enfriamiento cristales incoloros de forma prismática que desecados fundieron a 131-132° C.

TABLA I

Producto	Punto de fusión	Reacción con Cl_3Fe	Reacción con agua de Br.	Derivado acetilado P. f.
Muestra auténtica	170-171° C.	violeta púrpura	precip. inmediato	132-133° C.
Muestra problema	169-170° C.	violeta púrpura	precip. inmediato	131,5-132° C.

Por el mismo procedimiento que el descrito se acetiló una pequeña muestra de la sustancia patrón, y el producto acetilado se purificó como anteriormente se detalla. Mezcladas ambas íntimamente, no se observó depresión sensible en el punto de fusión. La Tabla I compara las propiedades de la sustancia patrón con la obtenida en este trabajo.

Tratamiento del residuo. Patulina.

El residuo obtenido después de haber aislado el metil-6-ácido salicílico pesaba 0,70 gr. (0,98—0,28 = 0,70 gr.), y presentaba aspecto oleoso y coloración marrón. Se desecó al aire, para desalojar los últimos residuos de éter de petróleo que pudiera contener, y se tomó (por ligero contacto con una varilla de agitación) una pequeña cantidad de material. Disuelto en agua (0,5 c. c.) y ensayado contra el *B. coli*, mostraba fuerte actividad antibacteriana.

Este material de aspecto aceitoso fué lavado con tetracloruro de carbono hirviente sobre baño de maría, y aún caliente, se filtró a través de papel de filtro ordinario, a fin de purgar la disolución de las pequeñas gotitas aceitosas que flotaban en el líquido, y la solución clara dejada enfriar lentamente a la temperatura del laboratorio. Al enfriarse el líquido adquiría una tonalidad opalescente. Estos lavados y subsiguientes filtraciones se continuaron hasta que el líquido filtrado de los lavados aparecía transparente al enfriarse. Reunidos los líquidos de todos los lavados, se dejó evaporar el disolvente a la temperatura ambiente, depositando una masa cristalina blanca, cuyo peso era de 0,57 gr. Se desecó en el vacío sobre P_2O_5. Punto de fusión del material crudo: 110,5°. Cristalizado en benceno (rombos incoloros), se observó un punto de fusión de 110-111° C. Otra determinación del punto de fusión del producto cristalizado en benceno dió 110,5-111° C. Peso total resultante de los 0,98 gr. de material crudo: 0,55 gr.

El material aislado y purificado por recristalización de benceno, tenía punto de fusión constante (110,5-111° C.), y era soluble en acetona, éter sulfúrico, acetato de etilo, alcoholes y en benceno hirviente. En agua fría se disolvía parcialmente y totalmente al calentar. Insoluble en éter de petróleo. Ensayos para la determinación del nitrógeno, azufre y halógenos en la sustancia, dió negativo. A una solución acuosa de la sustancia contenida en un tubo de ensayo, se le añadió varias gotas de solución acuosa de NO_3Ag. Al examinar el tubo veinticuatro horas más tarde, se observó en el fondo un pequeño depósito de color negro. A 1 c. c. de solución acuosa de la sustancia se añadieron varias gotas de solución de cloruro férrico al 4 por 100, no produciendo coloración alguna o formación de precipitado. Una muestra de solución alcohólica de la sustancia tratada por varias gotas de Cl_3Fe alcohólico al 4 por 100, tampoco dió coloración alguna ni formó precipitado. Si una solución acuosa del producto, contenida en un tubo de ensayo cerrado, se dejaba a la temperatura del laboratorio durante más de quince días, producía una coloración rojiza cuando se trataba por unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico. La solución acuosa era activa frente a los gérmenes Gram-positivos *(Staph. aureus)*, así como frente a los Gram-negativos *(B. coli)*, si bien su actividad contra los segundos era mayor.

Por consideración de las propiedades químicas expuestas, actividad antibacteriana y punto de fusión, se llegó a la conclusión de que bien podría tratarse del antibiótico patulina. La determinación del punto de fusión de la mezcla formada por la sustancia así obtenida y una muestra de patulina procedente del Departamento de Bioquímica de la «London School of Hygiene and Tropical Medicine», fundió a 110,5° C. Para mayor confirmación de la identidad de la sustancia anteriormente descrita, con la patulina se preparó su derivado acetilado.

Acetilación.—Se mezclaron 2,5 c. c. de anhídrido acético con 0,5 gr. de acetato sódico anhidro, hirviéndose la mezcla a continuación. Se llevó ésta a 100° C., mientras se añadía 0,5 gr. de patulina pulverizada con agitación y se dejaba enfriar la mezcla reaccionante a la temperatura ambiente. Se añadieron 100 c. c. de agua destilada, agitando y enfriando, formándose un líquido aceitoso de color marrón que se depositó en el fondo del matraz. Dejado reposar en la cámara frigorífica durante la noche, se obtuvieron cristales, que desecados fundieron a 115° C. Recristalizado el producto de alcohol etélico diluído, fundió a 117° C.

CONCLUSION

Raper y Thom, en su «Manual of the Penicillia», pág. 539, hacen notar que:

«La producción de los mismos productos metabólicos no se puede tomar *per se* como evidencia de identidad o de estrecha analogía entre dos cultivos diferentes de *Penicillium*. Frecuentemente, sin embargo, tal producción es un indicativo de relaciones naturales. En el caso del *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx creemos que esto es cierto. El criterio morfológico y cultural indica una estrecha relación entre esta especie y el *Penicillium urticae* Bainier (sin.: *Penicillium patulum* Bainier). La producción de ácido gentísco por esta especie y de ácido gentísico y de alcohol gentisílico por el *P. paiulum (P. urticae)*, aporta evidencia adicional de tal relación. Finalmente, la producción de ácido fúlvico por esta especie y por el *P. flexuosum (P. urticae)* creemos aportar nueva evidencia de la relación que tratamos de establecer.»

Siguiendo estas ideas expuestas por Raper y Thom, nosotros creemos haber aportado en este trabajo una prueba más en favor de la estrecha relación, por estos autores establecida, entre el *P. griseo-fulvum* Dierckx y el *P. patulum* Bainier aquí estudiado. Si el 6-metil ácido salicílico es uno de los productos resultantes en la fermentación del *P. griseo-fulvum* y nosotros aislamos este mismo producto metabólico de *P. patulum*, junto con patulina, esto aduciría una prueba más en favor de las analogías de tipo bioquímico que tan estrechamente relacionan ambas especies.

RESUMEN

En este trabajo se ha aislado el 6-metil ácido salicílico junto con patulina, ambos como productos metabólicos del *Penicillium patulum* Bainier.

Creemos que esto aporta una prueba más, de tipo bioquímico, en favor de la estrecha relación existente entre el *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx y el *Penicillium patulum* Bainier.

SUMMARY

From the culture fluid of *Penicillium patulum* Bainier 6-methyl salicylic acid (6-hydroxy-2-methylbenzoic acid) along with patulin have been isolated.

This finding supports Raper and Thom's point of view upon the close biochemical relationship between *Penicillium griseo-fulvum* and *Penicillium patulum.*

Uno de los autores (R. Lahoz) agradece a la «Fundación Juan March» la beca recibida, con cuya ayuda económica dió fin a este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

(1) Oxford, A. E.; Raistrick, H., y Simonart, P. 1935. Biochem. J., 20, 1102-1115.
(2) Anslow, W. K.; Raistrick, H., y Smith, G. 1943. J. Soc. Chem. Ind., 62, 236-238.
(3) Birkinshaw, J. H.; Bracken, A., y Raistrick, H. 1943. Biochem. J., 37, 726-728.
(4) Engel, B. G., y Brzeski, W. 1947. Helv. Chim. Acta, 30, 1472-8.
(5) Brian, P. W. 1949. Trans. Brit. Mycol. Soc., 32, 30-33.
(6) Raper, K. B., y Thom, C. 1949. A Manual of the Penicillia, pág. 539. Baltimore. The Williams and Wilkins Co.
(7) Anslow, W. K., y Raistrick, H. 1931. Biochem. J., 25, 39.
(8) Grosser, Annemarie, y Friedrich, W. 1948. Z. Naturforsch 3b. 380-I.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE MICOLOGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA ECOLOGIA DE LAS LEVADURAS

I.—Estudio de levaduras aisladas de hongos carnosos.

POR
CARLOS RAMÍREZ GÓMEZ (*)

INTRODUCCION

Existen diversos trabajos sobre la presencia de las levaduras en toda clase de sustratos: frutos dulces jugosos, especialmente en estado de descomposición; exudados de árboles; insectos visitadores de flores; flores; raíces cultivadas, almacenando abundante azúcar (remolacha en descomposición); néctar de las flores; taninos empleados en la curtición de las pieles; en el estiércol caballar y vacuno; suelos, etc. Pero, aunque se ha observado con frecuencia que las levaduras estaban presentes en los hongos carnosos en descomposición, existe muy poca literatura sobre su identificación.

A nuestro conocimiento, los primeros investigadores que han tratado de iniciar un estudio serio sobre levaduras de hongos carnosos han sido K. W. Anderson y C. E. Skinner (1947). Dichos autores aislaron 126 cepas de levaduras de 36 especies diferentes de hongos carnosos, pertenecientes a los géneros *Agaricus, Armillaria, Amanita, Amanitopsis,*

(*) Durante nuestra estancia en París, pensionado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas para realizar estudios sobre hongos superiores en el «Muséum National d'Histoire Naturelle», bajo la sabia dirección del profesor doctor Roger Heim, animados y aconsejados por él, emprendimos el presente trabajo.

Es para nosotros un agradable deber el agradecer desde estas líneas al profesor R. Heim los consejos y el apoyo prestado a nuestra investigación, así como a todo el personal científico del «Muséum d'Histoire Naturelle» que nos ha ayudado en nuestra tarea.

Cábeme agradecer finalmente al profesor doctor A. Socías, director del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, de Madrid, las facilidades otorgadas para disfrutar de la pensión concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, sin la cual no hubiera sido posible llevar a buen fin este trabajo.

Boletus, Clava-Calvatia, Collibia, Coprinus, Daedalea, Hypholoma, Lepiota, Panus, Peziza, Phallus, Pluteus, Pholiota, Polyporus, Russula, Mycena, Strobylomyces, Marasmius, Tremella y *Tricholoma.*

De las 126 cepas de levaduras aisladas, 55 pertenecían al *Saccharomyces cerevisiae;* 20 a *Saccharomyces delbruecki;* 4 a *Saccharomyces heterogenicus;* 9 a *Saccharomyces marxianus;* 6 a *Saccharomyces* sp.; 5 *Candida pulcherrima;* 1 *Candida utilis;* 5 *Candida zeilanoides;* 17 *Cryptococcus* sp. y 6 *Rhodotorula aurantiaca.*

Se observará en este estudio el predominio de las cepas ascosporógenas sobre las anascoporógenas.

Aage Lund (1954), en su «Studies on the ecology of yeasts», al estudiar las levaduras contenidas en muy diversos sustratos, observa que las anascosporógenas son las más frecuentes.

El hecho de que se hayan aislado un gran número de levaduras de hongos en descomposición indica que encuentran en éstos un habitat adecuado, pudiendo ser llevadas hasta ellos por los insectos, por el viento, en el polvo y por la lluvia.

MATERIAL Y METODOS

Los hongos de los que se han hecho los aislamientos de levaduras han sido recolectados en los bosques de los alrededores de París: forêt de Saint Germain, de Compiègne, de Fontainebleau, de Montmorency, de Marly, de Sénar, de Chantilly, de Rambouillet, bois de Meudon.

Después de recoger cada ejemplar de hongo, se cortaba un trozo de su sombrerillo, lo más asépticamente posible, y se guardaba en tubo estéril. El ejemplar era numerado y conservado para su determinación ulterior.

Los tubos eran incubados a 25° C, durante dos o tres días. Cuando el fragmento de hongo empezaba a descomponerse, se procedía al aislamiento de levaduras.

Para ello se vertía un poco de agua estéril en el tubo, agitando para tener una suspensión uniforme. Se hacían diluciones adecuadas, sembrando una gota, que se extendía en placa de Petri, con el medio siguiente: Agar malta con propionato sódico al 0,25 por 100.

El propionato sódico se añade al medio para evitar el desarrollo de

mohos y bacterias que pueden acompañar a las levaduras, sin perjudicar el desarrollo de las levaduras.

Después de purificarlas se hizo el estudio de las levaduras, con el fin de identificarlas.

Damos a continuación la lista de hongos y levaduras que se han aislado de ellos.

HONGO	LEVADURA
Amanita umbrino-lutea.	*Debaryomyces kloeckeri.*
» *rubescens.*	*Torulopsis inconspicua.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Saccharomyces cerevisiae.*
» *citrina.*	*Candida curvata.*
» »	*Saccharomyces cerevisiae.*
» *ovoidea.*	*Candida curvata.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *vaginata.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *spissa.*	*Candida curvata.*
» *phalloides.*	*Saccharomyces cerevisiae.*
» *lividopalescens.*	*Schizosaccharomyces zambettakesi* n. sp.
» *pantherina.*	*Saccharomyces cerevisiae.*
» *amplia.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida anomala* n. sp.
» »	*Debaryomyces kloeckeri.*
» *porphyria.*	*Saccharomyces cerevisiae.*
» *caesarea.*	*Candida curvata.*
» *muscaria.*	*Candida pulcherrima.*
Boletus scaber.	*Trichosporon cutaneum*, var. *multisporum.*
» *phaelleus.*	*Torulopsis inconspicua.*
» *aurantiacus.*	*Sporobolomyces boleticola* n. sp.
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*
» *badius.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*

HONGO	LEVADURA
Boletus badius.	*Trichosporon cutaneum*, var. *multisporum*
» *luteus.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*
» »	*Candida anomala* n. sp. (dos cepas).
» »	*Sporobolomyces boleticola* n. sp.
» *subtomentosus.*	*Torulopsis inconspicua.*
» »	*Debaryomyces kloeckeri.*
» *edulis*	*Saccharomyces cerevisiae.*
» *edulis* var. álba.	*Torulopsis buffoni* n. sp.
» *carpini.*	*Torulopsis inconspicua.*
» *leucophaeus.*	*Candida anomala* n. sp.
» *granulatus.*	*Debaryomyces subglobosus.*
» *pinicola.*	*Torulopsis inconspicua.*
» *erythropus.*	*Rhodotorula mucilaginosa.*
» *appendiculatus.*	*Rhodotorula minuta.*
» »	*Candida anomala* (dos cepas) n. sp.
Cantharellus cybarius.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*
Clavaria flava.	*Candida curvata.*
» *botrytis.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *obtusata.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Clitocybe odora.	*Saccharomyces cerevisiae.*
Clitopilus pruneolus.	*Torulopsis inconspicua.*
Coprinus atramentosus.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida anomala* n. sp.
» *atramentarius.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *fumetarius.*	*Debaryomyces kloeckeri.*
» »	*Trichosporon cutaneum.*
» *comarius.*	*Saccharomyces cerevisiae.*
Collybia maculata.	*Candida pulcherrima.*
» *confluens.*	*Torulopsis inconspicua.*
» *fusipes.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Cortinarius bolaris.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*

HONGO	LEVADURA
Cortinarius violaceus.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*
» *causticus.*	*Candida curvata.*
Crepidotus mollis.	*Torulopsis inconspicua.*
Cratarellus cornucopioides.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*
» *tubaeformis.*	*Candida curvata.*
Entoloma sericeum.	*Debaryomyces kloeckeri.*
Fistulina hepatica.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Gomphidius glutinosum.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *viscidus.*	*Saccharomyces cerevisiae.*
Hydnum repandum.	*Candida curvata.*
» »	*Candida anomala* n. sp.
Hygrophorus chrysaspis.	*Candida curvata.*
Hebeloma antracophilum.	*Candida pulcherrima.*
» *cristaliniferum.*	*Turolupsis inconspicua.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Helvella crispa.	Ninguna levadura.
Hipholoma fasciculatus.	*Trichosporon cutaneum.*
Inocybe asterospora.	Ninguna levadura.
» *bougardi.*	» »
» *geophilla.*	» »
» *griseo lilacina.*	» »
» *corydalina.*	» »
Laccaria laccata, v. *amethystina.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Lactarius venereus.	Ninguna levadura.
» *torminosus.*	» »
» *plumbeus.*	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *cilicioides.*	Ninguna levadura.
» *zonarius.*	» »
» *chrysoreus.*	» »
Lycoperdon piriformis.	» »
Lepiota meleagroides.	*Candida pulcherrima.*

HONGO	LEVADURA
Lepiota acuasquamosa.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Lefista inversa.	Ninguna levadura.
Marasmius peronatus.	» »
Mycena polygama.	*Candida curvata.*
Mucidula radicata.	*Candida curvata.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Pseudocoprinus diseminatus.	Ninguna levadura.
Panus stipticus.	» »
Melanoneura brevipes.	*Cryptococcus laurentii*, var. *magnum.*
Psalliota vielatica.	*Saccharomyces cerevisiae.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *campestris.*	*Torulopsis inconspicua.*
Pholliota destruens.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *aurivella.*	Ninguna levadura.
Paxillus involutus.	*Candida curvata.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
Psatyrella hydrophila.	*Candida curvata.*
Phodopaxillus truncatus.	Ninguna levadura.
» *nudus.*	*Debaryomyces kloeckeri.*
Rozites caperata.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» »	*Candida curvata.*
Russula knauti.	*Candida anomala* n. sp.
» *exampelina.*	*Candida curvata.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *nigricans.*	*Trichosporon cutaneum*, var. *multisporum*
» »	*Rhodotorula mucilaginosa.*
» *cyanoxantha.*	*Rhodotorula minuta.*
» *prodopoda.*	Ninguna levadura.
» *pseudointegra.*	*Trichosporon cutaneum*, var. *multisporum*
» *atropurpurea.*	*Rhodotorula mucilaginosa.*
» *ochroleuca.*	*Pullularia pullulans.*
Sarcodon rufescens.	» »
Scleroderma vulgare.	Ninguna.
Tricholoma sejunctum.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.

HONGO	LEVADURA
Tricholoma album.	*Candida humicola.*
» »	*Candida curvata.*
» »	*Sporobolomyces albidus* n. sp.
» *sulphureum.*	*Candida anomala* n. sp.
» *scioides.*	*Candida humicola.*
» *cartilagineum.*	Ninguna levadura.
» *psammotus.*	» »
Russula azurea.	*Rhodotorula mucilaginosa.*
» »	*Candida humicola.*
Tremellodon gelatinosum.	*Trichosporon cutaneum.*
Volvaria speciosa.	*Sporobolomyces albidus* n. sp.

De los 134 ejemplares de hongos recolectados, clasificados en 43 géneros y 107 especies diferentes, se han aislado 117 cepas de levaduras repartidas en 10 géneros y 18 especies diferentes. De las 18 especies, 5 son nuevas: una pertenece al género *Schizosaccharomyces*, una al género *Torulopsis*, una al género *Candida* y dos al género *Sporobolomyces*. Las restantes especies pertenecen a los géneros *Torulopsis, Saccharomyces, Candida, Trichosporon, Cryptococcus, Pullularia* y *Debaryomyces*.

Ordenándolas por la frecuencia de aislamientos, tendremos:

Sporobolomyces albidus, n. sp., aislada en 31 hongos.
Candida curvata, aislada en 23 hongos.
Candida anomala n. sp., aislada en 10 hongos.
Torulopsis inconspicua, aislada en 10 hongos.
Saccharomyces cerevisiae, aislada en 9 hongos.
Debaryomyces klaeckeri, aislada en 6 hongos.
Candida pulcherrima, aislada en 4 hongos.
Trichosporon cutaneum var. *multisporum*, aislada en 4 hongos.
Candida humicola, aislada en 3 hongos.
Rhodotorula mucilaginosa, aislada en 4 hongos.
Trichosporon cutaneum, aislada en 3 hongos.

CUADRO GENERAL DE FERMENTACIONES Y ASIMILA

LEVADURAS	Fermentación					
	Gl	Ga	Sa	Ma	La	Ra
Debaryomyces:						
Kloeckeri...	—	—	—	—	—	—
Subglobosus...	—	—	—	—	—	—
Schizosaccharomyces:						
zambettakesi n. sp.	—	—	—	—	—	—
Saccharomyces:						
cerevisiae	+	+	+	+	—	1/3 +
Sporobolomyces:						
albidus n. sp.	—	—	—	—	—	—
boleticola n. sp.	—	—	—	—	—	—
Torulopsis:						
buffoni n. sp.	+	—	—	—	—	—
inconspicua	—	—	—	—	—	—
Cryptococcus:						
laurentii var. magnum	—	—	—	—	—	—
Candida:						
curvata	—	—	—	—	—	—
anomala n. sp	—	+	d +	d +	d +	d +
pulcherrima	—	d +	—	—	—	—
humicola	—	—	—	—	—	—
Trichosporon:						
cutaneum	—	—	—	—	—	—
cutaneum, v. multisporum ...	—	—	—	—	—	—
Rhodotorula:						
minuta	—	—	—	—	—	—
mucilaginosa	—	—	—	—	—	—
Pullularia:						
pullulans	—	—	—	—	—	—

Gl = glucosa; Ga = galactosa; Sa = sacarosa; Ma = maltosa; La = lactosa; Ra = rafinosa; d = débil; v = variable.

CIONES DE LAS LEVADURAS AISLADAS DE HONGOS

Asimilación								N.º de cepas
Gl	Ga	Sa	Ma	La	NO_3K	Arbutina	Etanol	
+	+	+	+	—	—	+	—	6
+	+	+	+	+	—	+	—	1
+	+	+	+	+	—	—	—	1
+	+	+	+	—	—	—	—	9
+	+	+	+	—	—	+	—	31
+	—	+	+	—	—	+ d	—	2
+	—	—	—	—	+	+	—	1
+	—	—	—	—	—	—	+	10
+	+	+	+	+	—	+ d	—	1
+	+	+	+	+	—	—	+	23
+	+	+	+	—	—	+ v	—	10
+	d +	+	+	—	—	—	—	4
+	+	+	+	+	—	+	+ d	3
+	+	+	+	+	—	—	—	3
+	+	+	+	+	—	—	—	4
+	—	+	—	—	—	—	—	2
+	d +	+	—	—	—	+	+ v	4
+	d +	+	+	—	+	+	—	2

TOTAL . . 117

Sporobolomyces boleticola, n. sp., aislada en 2 hongos.
Rhodotorula minuta, aislada en 2 hongos.
Pullularia pullulans, aislada en 2 hongos.
Debaryomyces n, gen. n. sp., aislada de 1 hongo.
Schizosaccharomyces zambettakesi n. sp., aislada de un hongo.
Torulopsis buffoni n, sp., aislada de 1 hongo.
Cryptococcus laurentii, var. *magnum,* aislada de 1 hongo.

Como puede verse, la familia *Cryptococcaceae* o levaduras anascosporógenas está representada aproximadamente por un 60 por 100 de cepas; sigue en número la familia *Sporobolomycetaceae,* con un 28 por 100, y el grupo menos numeroso está integrado en la familia *Endomycetaceae,* con un 12 por 100 de cepas.

Nuestros resultados son más parecidos a los obtenidos por Aage Lund (1954), en Dinamarca, que a los que obtuvieron Anderson y Skinner (1947) en Estados Unidos. Cosa natural, pues es más fácil que la flora microbiana de las distintas regiones europeas se parezca entre sí, que a la flora microbiana americana.

De las 117 cepas de levaduras aisladas, 23 fermentan los azúcares. Las restantes, exceptuando 10 cepas de *Torulopsis inconspicua* y una de *Torulopsis buffoni* n. sp., tienen fuerte poder asimilador de azúcares, por lo que deben encontrar en los hongos que les sirven de habitat una fuente importante de alimentos hidrocarbonados. Adrian y Cruz (1933) han estudiado la composición química de varios hongos, encontrando en muchos más o menos cantidades de monosacáridos. En muchos casos han encontrado cantidades considerables de trehalosa. Aunque este azúcar no es asimilado por muchas levaduras, la hidrólisis de este azúcar a glucosa es llevada a cabo por los enzimas del hongo o por las bacterias acompañantes.

No daremos con detalle la descripción de cada una de las especies aisladas por nosotros, exceptuando las especies nuevas. Remitimos para ello a las obras especializadas, especialmente «The Yeasts», de Lodder y Kregervan Rij (1952). Hemos creído, sin embargo, conveniente el presentar en forma de cuadro sus peculiaridades fisiológicas.

Seguidamente damos con detalle la descripción de las nuevas especies.

DESCRIPCION DE LAS NUEVAS ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS DE HONGOS

Schizosaccharomyces zambettakesi n. sp.

En extracto de malta.—A los tres días de incubación a 25° C., las células son ovales o cilíndricos (fig. 1), muy largas, midiendo (4-7). (11-50) micras. Pueden encontrarse también fragmentos de micelio, con diámetro de 4 a 7 micras. La multiplicación vegetativa se verifica por tabi-

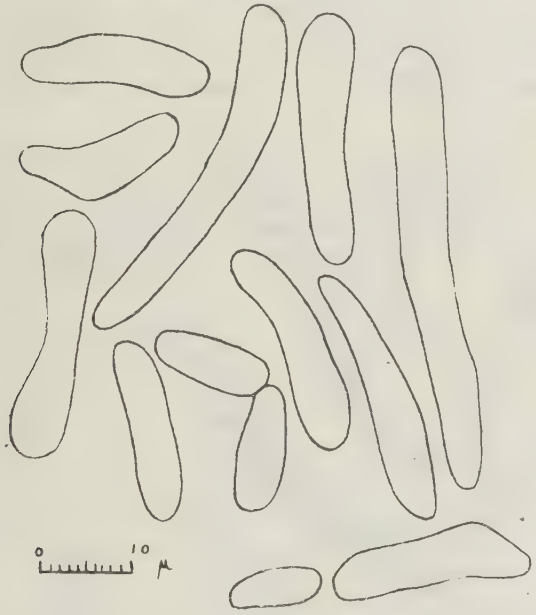


FIG. 1.
Schizosaccharomyces zambettakesi, n. sp. Células en extracto de malta a los tres días a 25° C.

cación. Se encuentran a menudo células con tabiques. Forma velo mucoso y depósito.

Al cabo de un mes a 17° C., el velo engruesa tanto que ocupa todo el matraz de cultivo formando una masa pastosa de células repletas de grasa.

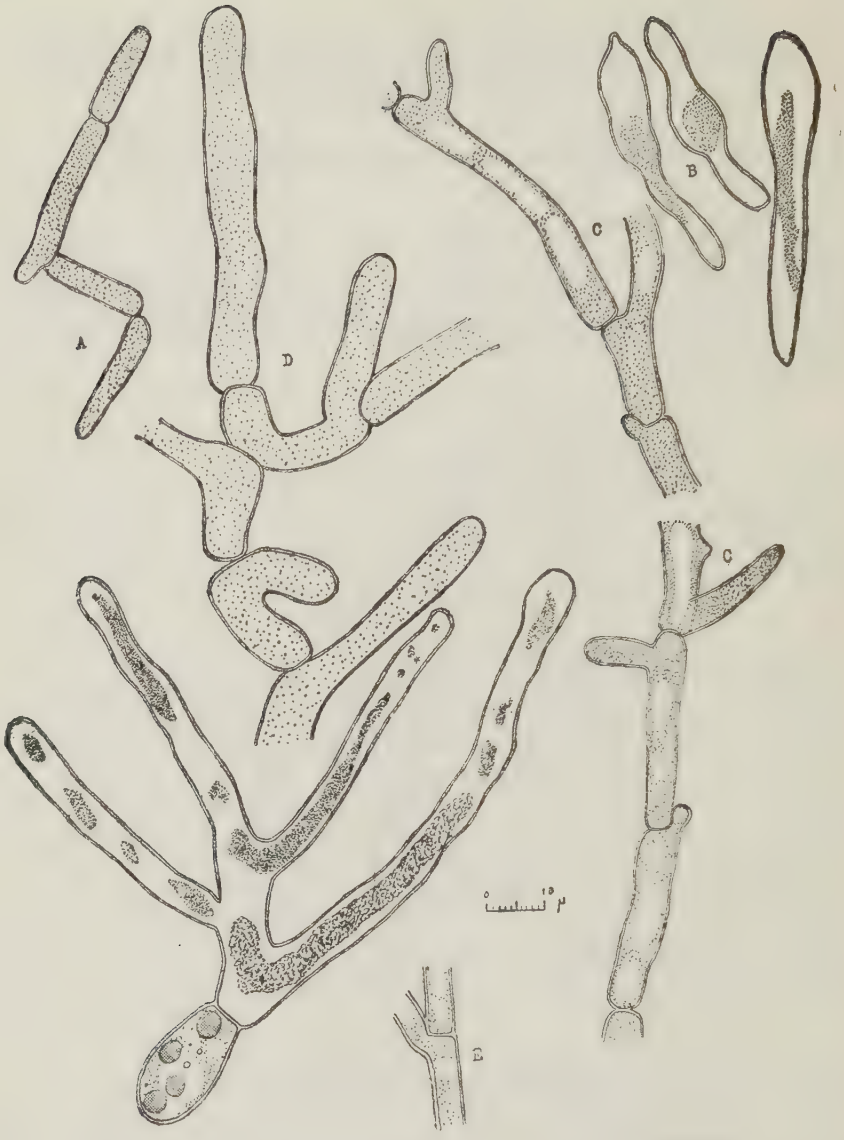


FIG. 2.
Schizosacharomyces zambettakesi n. sp. A, Micelio rompiéndose en artrosporas. B., células sueltas. C, Micelio con yemas en distintas fases de desarrollo y tabiques bien desarrollados. D, Micelio en vías de desarticulación en artroporas. E, Fragmento de micelio mostrando un tabique bien desarrollado. F, Célula iniciando la formación de micelio ramificado. (Media de agar patata.)

Estrías sobre agar malta.—Al mes a la temperatura del laboratorio (17° C.) es brillante, de color crema, lisa o algo rugosa, con franja de micelio en el borde. El micelio tiene tendencia a desarrollarse mejor en profundidad.

Cultivo sobre porta.—Se forma micelio verdadero (fig. 2). La formación del micelio tiene lugar a partir de una célula aislada (fig. 2, F), que se alarga extraordinariamente y se ramifica, formándose el primer tabique entre la célula y las ramas. Estas, a medida que se alargan, son cortadas transversalmente por tabiques (fig. 2, C y E). Cuando el micelio alcanza cierto desarrollo, los extremos de las células van abombándose, empezando a despegarse entre sí los tabiques (fig. 2, D y A), quedando las células sueltas, formando de este modo las llamadas artrosporas. Estas pueden ser redondeadas o cilíndricas más o menos largas, (fig. 3, C). El desarrollo del micelio es estimulado en condiciones anaerobias.

Esporulación.—Las ascosporas se forman previa conjugación de artrosporas o de dos células contiguas del micelio (fig. 3). Se forman de 1 a 8 esporas por asca. Las ascosporas son redondas u ovales y de gran tamaño, pudiendo llegar e medir 6,5 micras de diámetro. Están repletas de gotas de grasa.

Fermentación.—Negativa.

Asimilación de azúcares:

Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+

Asimilación de nitrato potásico.—Negativa.

Asimilación de etanol como fuente de carbono.—Negativa.

Procedencia.—Se ha aislado una sola cepa de sombrerillo de *Amanita livido pallescens.*

Discusión.—Esta especie, por la formación de artrosporas que se conjugan antes de la producción de ascas y por tener las células del micelio uninucleadas, entra dentro del género *Schizosaccharomyces* Lindner; pero, por no fermentar ningún azúcar, se diferencia de todas las especies de dicho género descritas hasta ahora, por lo que proponemos sea incluí-

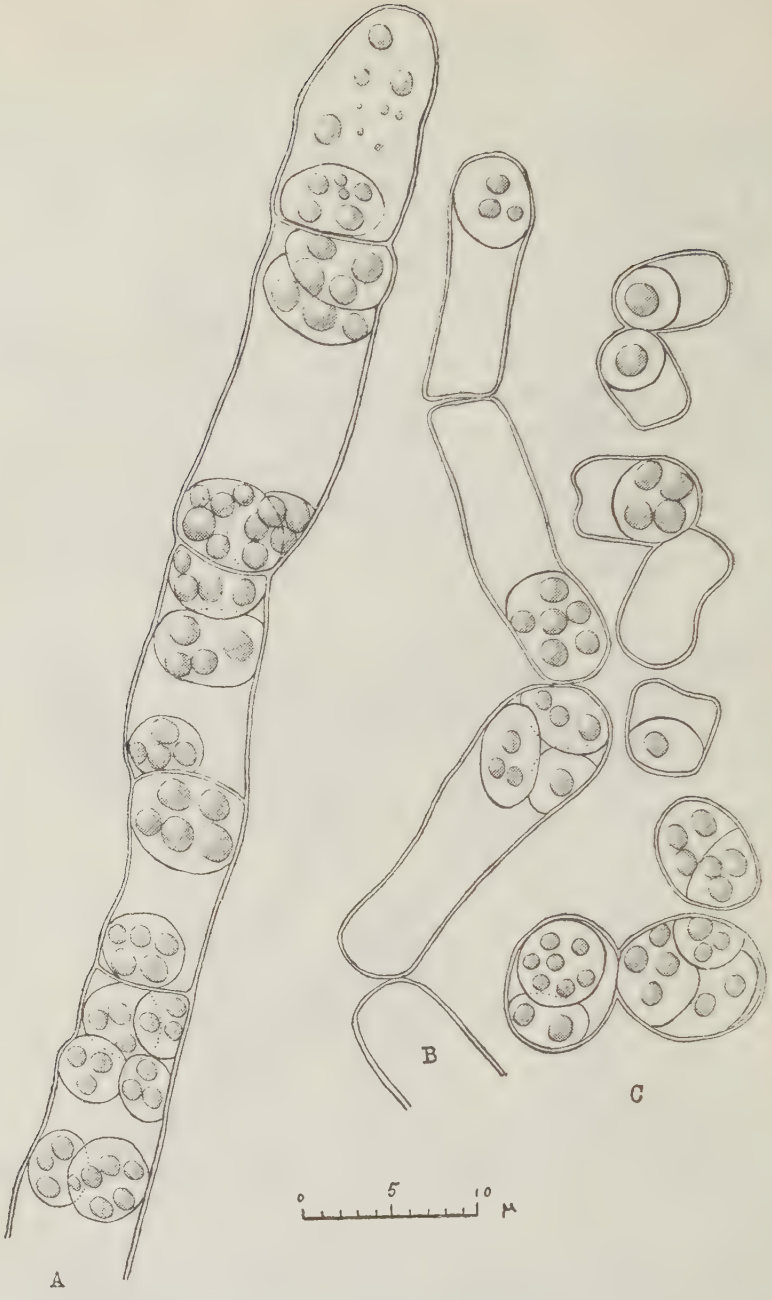


FIG. 3.

Schizosaccharomyces zambettakesi, n. sp. A, Micelio con sus células transformadas en ascas, conteniendo ascosporas repletas de gotas de grasa. B, Micelio rompiéndose en artrosporas, conteniendo ascosporas. C, Artrosporas sueltas y en conjugación, conteniendo ascosporas. En medio V8 de Wickerham.

da entre ellas como una especie nueva, con el nombre de *Shizosaccharomyces zambettakesi,* que dedicados al doctor Ing. Ch. Zambettakis, investigador del «Laboratoire de Cryptogamte del Muséum National d'Histoire Naturelle» de París.

Esta levadura se conserva en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología de Madrid, con el núm. IJFM 490.

Diagnosis latina.—In musto maltato cellulae ovoideae aut cylindricae, (4-7). (11-50)μ; pauce cellulae mycelii. Pellicula formatur. Pellicula facile cadet ad fundum. (post unum mensem, 17° C.) materia pelliculosa flavida, valde mucosa, formata est.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C.) flavalbida, nitida, glabra aut parum crispulata, margine interdum piloso atque undulato.

Mycelium verum cum arthrosporis.

Copulatio arthrosporarum conformationi asci plerumque praecedit. Ascosporae rotundae aut ovoideae, 1-8 in asco.

Fermentatio nulla. In medio minerali cum glucoso, galactoso, saccharo, maltoso, lactoso crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit. Arbutinum non finditur.

Clave de especies del género Schizosaccharomyces.

1 a.	Especies con hasta 8 esporas por asca	(2)
b.	Especies que no pasan de 4 esporas por asca ...	*Sch. pombe*
2 a.	Sin micelio verdadero	*Sch. octosporus*
b.	Con micelio verdadero que se rompe en artrosporas ...	(3)
3 a.	Fermentación de azúcares positiva	*Sch. versatilis*
b.	Fermentación de azúcares negativa.	*Sch. zambettakesi,* n. sp.

Candida anomala n. sp.

En extacto de malta.—A los tres días de incubación a 25° C., las células son corto ovales (fig. 4) de (2,5-4,5) . (4-5,5) micras; de gemación multipolar. Se forma anillo fino y depósito abundante.

Al cabo de un mes a la temperatura del laboratorio (17° C.), el anillo es bien manifiesto y el depósito muy abundante.

Estría sobre agar-malta.—Al mes, a la temperatura del laboratorio,

es casi mate o poco brillante, de color crema blanquecino, algo crateriforme en su superficie y de borde ondulado.

Cultivo sobre porta.—Sobre medio de agar-patata tiene seudomicelio

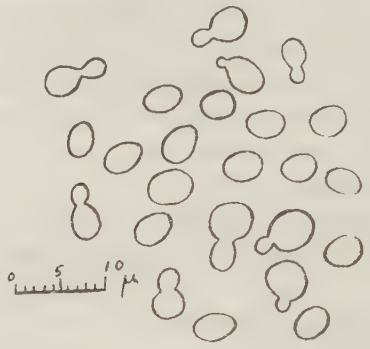


FIG. 4.
Candida anomala, n. sp. Células en extracto de malta, a 25° C., a los tres días.

bien desarrollado del tipo «Candida» (fig. 5), con verticilos de blastosporas ovales.

Esporulación.—Negativa.

Fermentación.

Glucosa	+	
Galactosa	+	
Sacarosa	+	(débil)
Maltosa	+	(débil)
Lactosa	+	(débil)
Rafinosa	+	(débil) menos de 1/3

Asimilación de azúcares.

Glucosa	+	
Galactosa	+	
Sacarosa	±	
Maltosa	+	
Lactosa	—	(muy débil con el método de Wickerham).

Asimilación de nitrato potásico.—Negativa.

Asimilación de etanol como fuente de carbono.—Negativa.

Hidrolisis de la arbutina.—Variable según las cepas. En las cepas IJFM 492 y 500 es negativa; en las cepas IJFM 491, 493, 495, 498 y 499 es

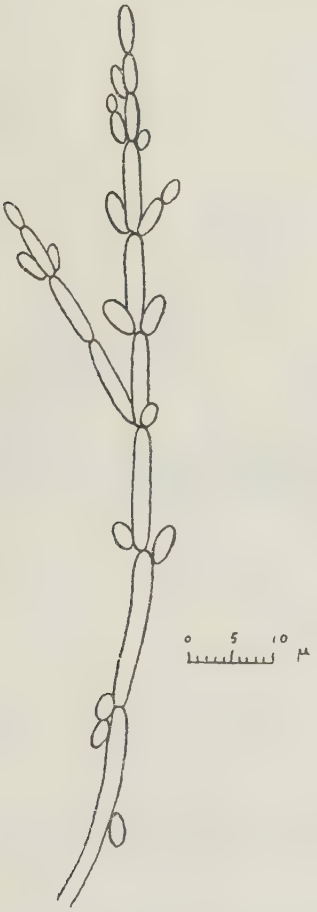


FIG. 5.
Candida anomala, n. sp. Seudomicelio en medio de agar patata a los seis días de incubación a 25° C.

ligeramente positiva y en las cepas IJFM 496 y 497 es fuertemente positiva.

Procedencia.—Se han aislado diez cepas diferentes a partir de los siguientes hongos: IJFM 491, de *Tricholoma sulphureum;* IJFM 492, de *Boletus luteus;* IJFM 493, de *Hydnum repandum;* IJFM 494, de *Amanita ampliia;* IJFM 495, de *Boletus leucophaeus;* IJFM 496, de *Boletus*

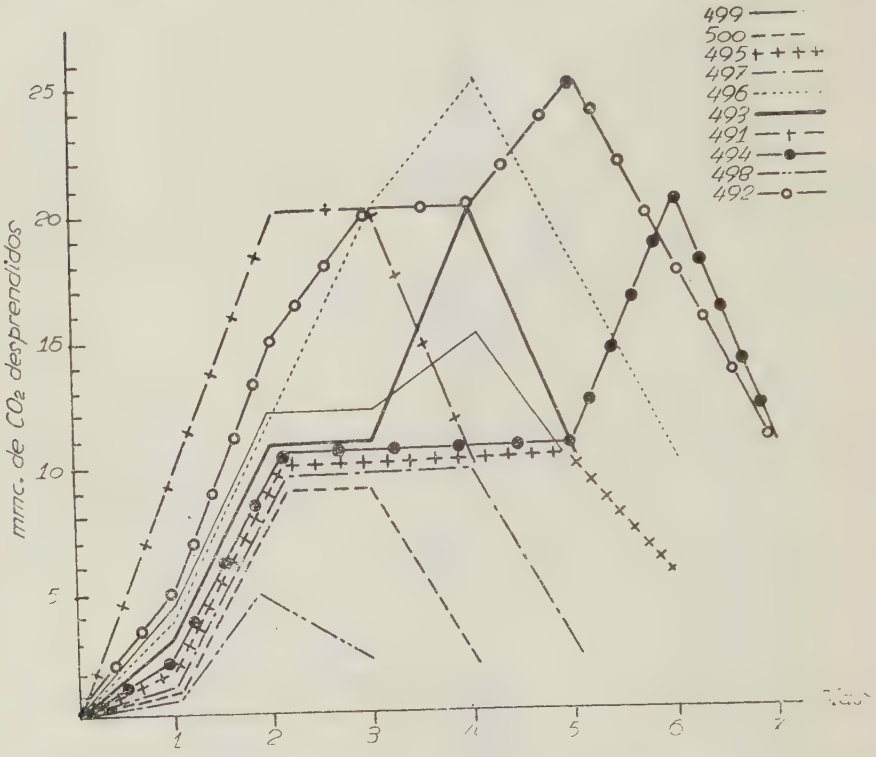


FIG. 6.
Comparación de las curvas de fermentación de la sacarosa por diez cepas de *Candida anomala,* n. sp.

luteus; IJFM 497, de *Russula knauti;* IJFM 498, de *Coprimus atramentosus;* IJFM 499, de *Boletus appendiculatus;* IJFM 500, de *Boletus appendiculatus.*

Discusión.—Esta especie se diferencia claramente de todas las espe-

cies del género *Candita* Berkhout, descritas hasta ahora, por lo que hacemos de ella una especie nueva, para la que proponemos el nombre de *Candida anomala*. Le damos este nombre específico por la anomalía de fermentar, aunque sea débilmente, la lactosa, y, en cambio, no asimilarla, caso muy raro en las levaduras.

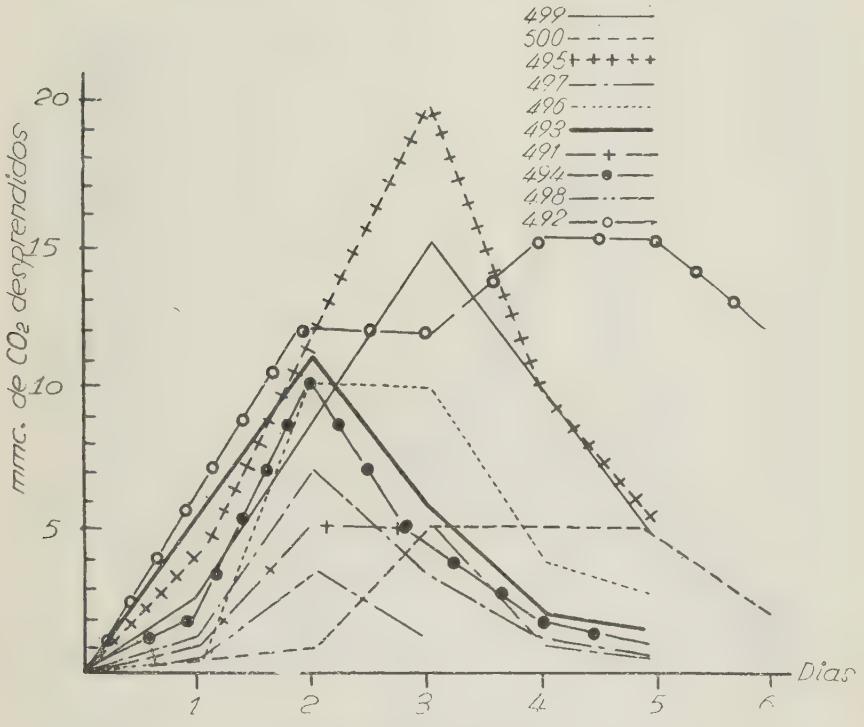


FIG. 7.
Comparación de las curvas de fermentación de la maltosa por diez cepas de *Candida anomala*, n. sp.

En la figuras 6, 7, 8 y 9 representamos las gráficas de fermentación de las diez cepas de *Candida anomala* n. sp. frente a la sacarosa, la maltosa, la lactosa y la rafinosa, respectivamente.

Estudiando las gráficas de la figura 6, vemos que las cepas 496 y 492 fermentan la sacarosa con la misma intensidad, obteniéndose el mismo máximo para ambas; aunque la núm. 492, al tercer día de fermentación,

se mantiene estacionaria, llegando al máximo con un día de retraso con respecto a la núm. 496.

Las cepas 491, 493 y 494 alcanzan el mismo máximo, aunque los tiempos son distintos para las tres. La núm. 493 se retrasa un día con respecto a la 491, y la 492 se retrasa cuatro días con respecto a esta última.

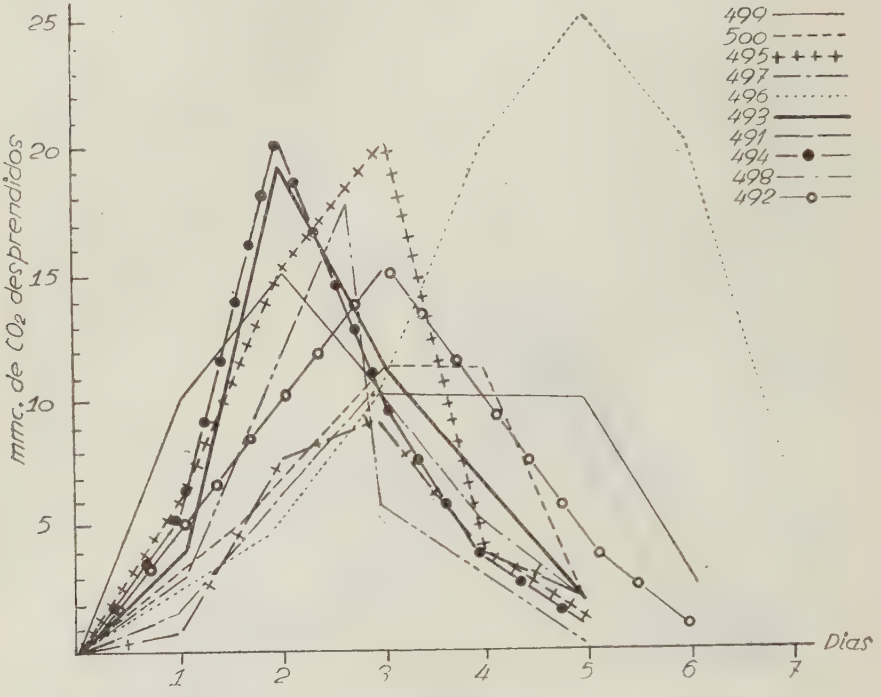


FIG. 8.
Comparación de las curvas de fermentación de la lactosa por diez cepas de *Candida anomala*, n. sp.

Las cepas 495, 497 y 500 tienen los mismos máximos, con retrasos de uno y dos días para las 497 y 495 con respecto a la 500. La cepa 498 queda bastante alejada de las demás por la poca intensidad de su fermentación.

Resumiendo, se pueden agrupar estas diez cepas, respecto a su poder fermentativo de la sacarosa, en cuatro grupos: 1) Números 496 y 492, de máximo poder fermentativo. 2) Números 491, 493 y 494, de mediano

poder fermentativo. 3) Números 495, 497 y 500, de débil poder fermentativo. 4) Número 498, de muy débil poder fermentativo.

En la figura 7 la cepa núm. 495 es la de máximo poder fermentativo de la maltosa. Le siguen las núms. 492 y 499, con idéntico máximo, re-

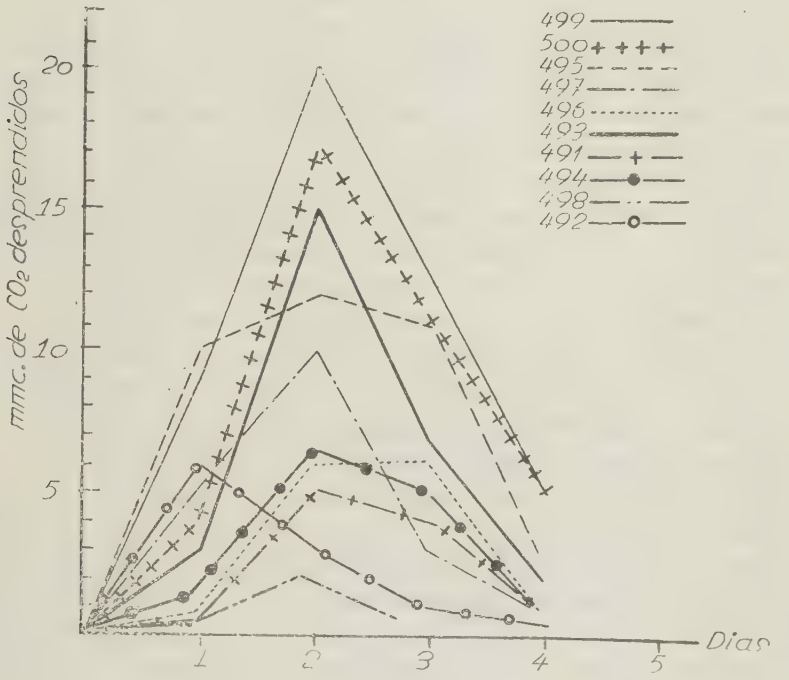


FIG. 9.
Comparación de las curvas de fermentación de la rafinosa por diez cepas de *Candida anomala*, n. sp.

trasadas en la 492 en un día. Siguen a éstas las núms. 493, 496 y 494, con el mismo máximo aproximadamente. Vienen a continuación en orden decreciente las núms. 497, 491 y 500, quedando la última la núm. 498, como en la fermentación de la sacarosa.

En la figura 8 se puede ver que la cepa núm. 496 fermenta al máximo la lactosa, aunque lo hace lentamente, retrasándose en llegar a dicho máximo en tres días con respecto a las demás. Siguen a ésta las números 494, 493, 495 y 498. Vienen en orden decreciente las núms. 492 y 499

con los mismos máximos y un día de diferencia las cepas núms. 500, 497 y 491.

En la figura 9 se ve que la cepa núm. 499 alcanza el máximo grado de fermentación de la rafinosa, siguiéndole en orden decreciente las número 495, 493, 500, 497, 492, 494, 496, 491 y, alejada de las demás por su débil fermentación, la 498.

Comparando las cuatro figuras entre sí se observa una irregularidad de comportamiento en la fermentación de los distintos azúcares por una misma cepa. Las cepas de comportamiento más normal son las números 495, 499 y 493, que no tienen grandes variaciones en la fermentación de los cuatro azúcares.

Las diez cepas de *Candida anomala*, n. sp., descrita anteriormente, se conservan en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología de Madrid, con los números arriba indicados.

Diagnosis latina.—In musto maltato cellulae ovoideae aut globosae (2,5-4,5) . (4-5)μ; singulae aut binae. In propagatione vegetativa gemmae ab omni latere formantur. Sedimentum anulusque subtilis formantur.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C.) glabra, surda, albida, margine glabro aut undulato.

Pseudomycelium abundat; parum ramosum. Blastosporae ovoideae, catenatae aut verticillatae.

Fermentatio glucosi, galactosi, sacchari (exigua), maltosi (exigua), lactosi (exigua), rafinosi (exigua). In medio minerali cum glucoso, galactoso, saccharo, maltoso crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit. Arbutinum finditur aut non finditur.

Torulopsis buffoni, n. sp.

En extracto de malta.—A los tres días de incubación a 25° C., las células son largo ovales (fig. 10), de (2,5-3) . (8-15) micras. Forma anillo fino y depósito.

Al cabo de un mes a la temperatura del laboratorio (17° C.), forma velo mucoso, anillo grueso y depósito abundante.

Estría sobre agar malta.—Al cabo de un mes a la temperatura del laboratorio, la estría es algo brillante, algo mucosa, casi lisa, de borde liso y de color blanco amarillento, tirando a parduzco.

Cultivo sobre porta.—Sin seudomicelio.
Esporulación.—Negativa.
Fermentación.—Negativa.
Asimilación de azúcares.

Glucosa	+
Galactosa	—
Sacarosa	—
Maltosa	—
Lactosa	—

Asimilación de nitrato potásico.—Positiva.
Producción de almidón.—Negativa.

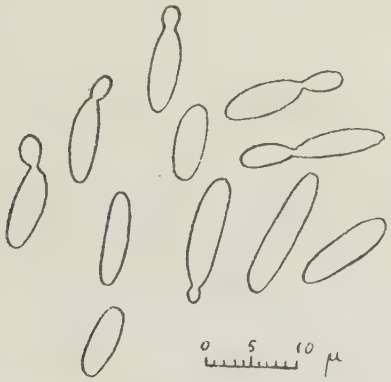


FIG. 10.
Torulopsis buffoni, n. sp. Células en extracto de malta a los tres días, a 25° C.

Asimilación de etanol como fuente da carbono.—Negativa.
Hidrólisis de la arbutina.—Positiva.

Procedencia.—Ha sido aislada una sola cepa de sombrerillo de *Boletus edulis*, variedad *alba*, en el que se encontraban manchas rojas.

Discusión.—Esta especie de levadura se distingue muy bien de las especies del género *Torulopsis* hasta ahora descritas, teniendo más analogías con *Torulopsis nitratophila* Shefrine and Phaff (1955); pero se di-

ferencia ampliamente de ésta por producir velo mucoso, por sus células mucho más largas, por no fermentar en absoluto la glucosa y por no asimilar la galactosa. Por ello hacemos de ella una nueva especie, para la que proponemos el nombre de *Torulopsis buffoni.*

Esta levadura se conserva en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología de Madrid con el núm. IJFM 501.

Diagnosis latina.—In musto maltato cellulae longovoideae (2,5-3). (8-15)μ; sedimentum anulusque subtilis formantur. Post unum mensen, (17° C.), pellicula mucosa, sedimentum et anulus crassus formantur.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C.), satis nitida, glabra, flavalbidobruna, plana et mollis.

Pseudomycelium nullum.

Fermentatio nulla. In medio minerali cum glucoso crescit. Nitras kalicus assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit. Arbutínum finditur.

Sporobolomyces albidus, n. sp.

En extracto de malta.—A los tres días de incubación a 25° C., las células son eminentemente polimorfas, ovaladas, alargadas, en forma de limón, en forma de botella, trigonopsoides (fig. 11), de (3-7) . (5-15) micras las ovaladas, pudiendo alcanzar las largas 45 o más micras de longitud. Se forma anillo, depósito y velo muy fino.

Al cabo de un mes, a la temperatura del laboratorio (17° C.), el anillo es grueso y el velo mucoso y caedizo.

Estrías sobre agar malta.—Los primeros días es pastosa, cérea, casi lisa, de color blanco amarillento. Al cabo de un mes a 17° C., es más o menos mucosa, muy arrugada en toda su superficie, de color crema, tirando a parduzco, cubriéndose de pelosidad finísima de color blanco en las partes más secas. Borde con franja de seudomicelio.

Cultivo sobre porta.—Sobre medio de agar-patata, tiene seudomicelio bien desarrollado (fig. 12, B, C y D), formado por células alargadas y curvadas, con verticilos de blastosporas ovales (fig. 12, C.). En algunas células del seudomicelio se forman esterigmas (fig. 12, B.), que producen cadenas de ballestosporas de formas muy variadas, pero generalmente fusiformes y repletas de grasa. Estas ballestosporas primarias (fig. 12, A)

producen, a su vez, sobre esterigmas esporas secundarias, generalmente ovaladas o en forma de botella (fig. 13), que, a su vez, producen esporas terciarias, y así sucesivamente, siendo las esporas secundarias menores que las primarias, las terciarias menores que las secundarias, etc. No se ha observado lanzamiento de esporas característico de los *Sporobolomycetaceae*, pero la formación de esterigmas sobre los que nacen las espo-

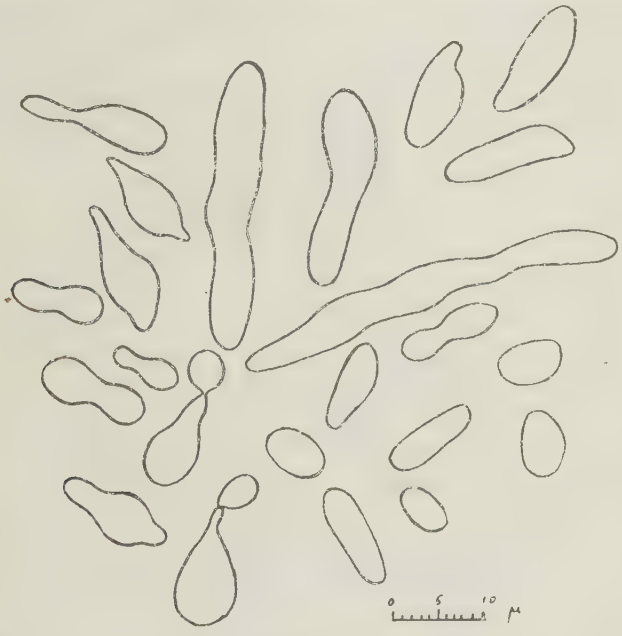


FIG. 11.
Sporobolomyces albidus, n. sp. Células en extracto de malta a los tres días de incubación a 25° C.

ras no permiten dudar en colocar esta especie en la familia *Sporobolomycetaceae*.

Sobre medios de esporulación de Wickerham, Starkey y Adams, producen gran cantidad de grasa en el interior de las células.

Fermentación.—Negativa.

Asimilación de azúcares:

Glucosa	+
Sacarosa	+

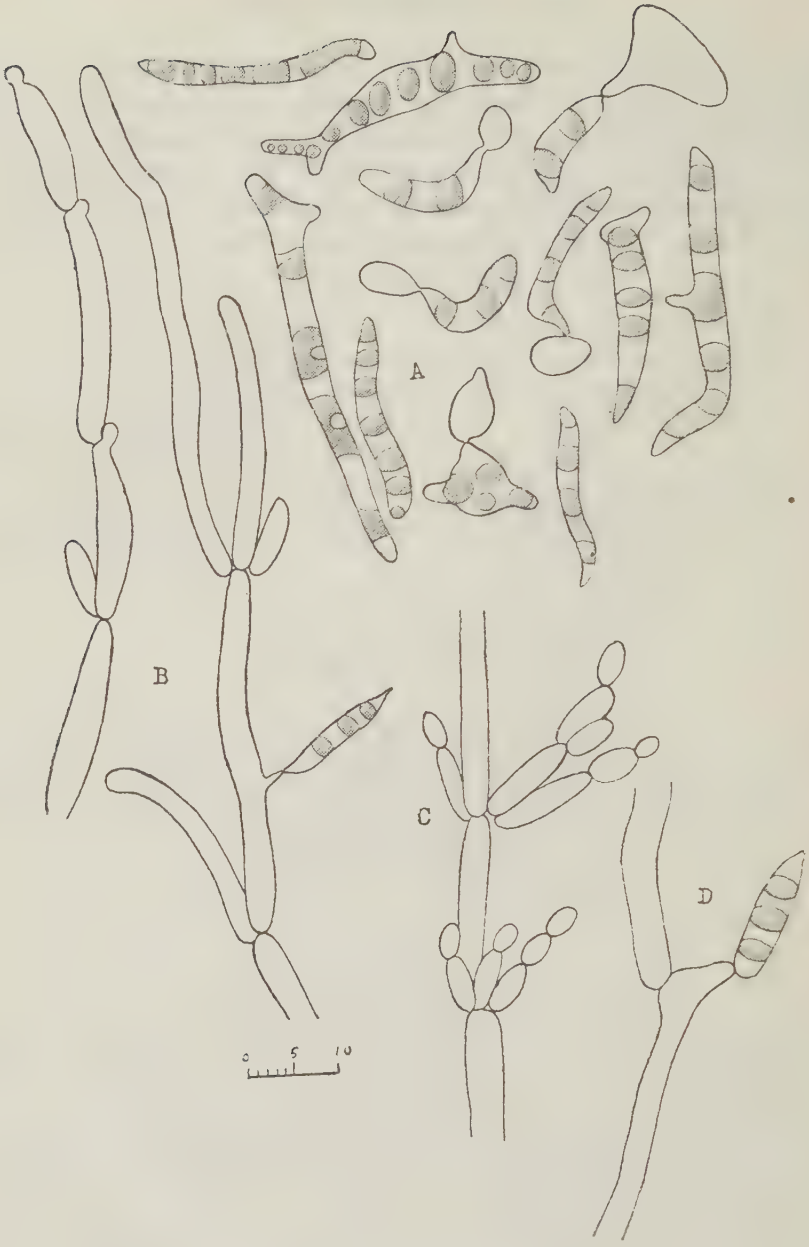


FIG. 12.
Sporobolomyces albidus, n. s. A, Esporas primarias cargadas de grasa y esporas secundarias. B. Seudomicelio, con células curvadas; en una de ellas, una ballestospora sobre un esterigma. C, Seudomicelio con verticilos de blastosporas ovales. D. Seudomicelio con una ballestospora.

Galactosa	+
Maltosa	+
Lactosa	—

Asimilación de nitrato potásico.—Negativa.

Asimilación de etanol como fuente de carbono.—Negativa.

Hidrólisis de la arbutina.—Positiva.

Procedencia.—Se han aislado 31 cepas de esta especie del sobrerillo de los hongos siguientes.

Rocites caperata, Laccaria laccata, var. *amethystina; Cortinarius bo-*

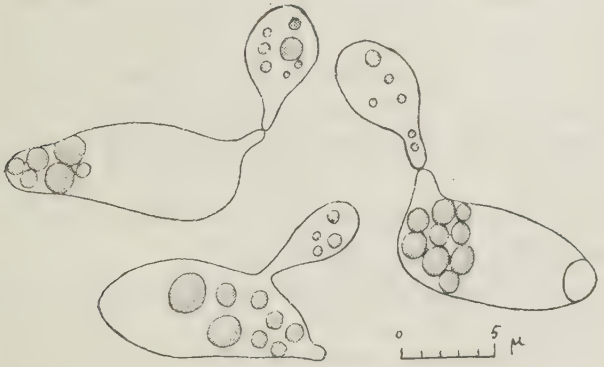


FIG. 13.
Sporobolomyces albidus, n. sp. Ballestosporas secundarias, produciendo esporas terciarias.

laris, Clavaria botrytis, Cantharellus cybarius, Coprinus atramentarius, Boletus badius, Clavaria obtusata, Trichatoma album, Cratarellus cornucopioides, Boletus luteus, Cortinarius violaceus, Amanita ovoidea, Mucidula radicata, Gomphidius glutinosus, Boletus subtomentosus, Lactarius plumbeus, Lepiota acuasquamosa, Collybia fusipes, Amanita amplia, Tricholoma sejunctum, Psalliota vielatica, Pholiota destruens, Boletus aurantiacus. Fistulina hepatica, Paxillus involutus, Volvaria speciosa, Russula exampelina, Coprinus atramentosus, Amanita rubescens, Hebeloma cristaliniferum.

Se conservan en la colección del Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología de Madrid, con los números del IJFM 502 al IJFM 532.

Discusión.—Esta especie de levadura, según la diganosis de los géneros *Sporobolomyces* Kluyver et van Niel y *Bullera* Derx, de la familia

Sporobolomycetaceae, quedaría como un término intermedio entre ambos; por tener color blanco amarillento, podría incluirse entre las especies del género *Bullera* Derx, pero aunque no posee colores rosados, que caracterizan las especies hasta ahora descritas en el género *Sporobolomyces* Kluyver, forma en cambio seudomicelio bien desarrollado, las ballestosporas son asimétricas, caracteres propios de este género. Por ello creemos que una diferencia de color no es carácter suficiente para distinguir esta especie dentro de un género nuevo, y nos inclinamos a situarla en el género *Sporobolomyces*. Por distinguirse perfectamente de todas las especies de dicho género, descritas hasta ahora, hacemos de ella una especie nueva, para la que proponemos el nombre de *Sporobolomyces albidus*, n. sp.

Diagnosis latina.—In musto maltato cellulae multae formae, ovoideae aut longovoideae (3-7) . (5-15)μ; sedimentum, anulus subtilis et pellicula subtilis formantur. Post unum mensem (17° C.) anulus crassus et pellicula mucosa formantur.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem) (17° C.) satis mucosa, flavifusca aut flavalbida, valde crispulata.

Pseudomycelium abundat. Cellulae pseudomycelii curvatae. Blastosporae verticillantae.

Ballistosporae fusiformae formantur.

Fermentatio nulla. In medio minerali cum glucoso, galactoso, maltoso, saccharo crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit. Arbutinum finditur.

Sporobolomyces boleticola, n. sp.

En extracto de malta.—A los tres días de incubación a 25° C., las células son algo cilíndricas, con una ligera constricción en su parte media, dándoles un poco el aspecto de un cacahuete (fig. 14), de (3,5-6) . (9-16) micras.

Forma anillo fino y depósito.

Al cabo de un mes a 17° C., forma velo y depósito.

Estría en agar malta.—Al cabo de un mes, a la temperatura del laboratorio (17° C.), en la cepa IJFM 533 es pastosa, algo brillante y lisa, de color de minio. En la cepa IJFM 534 es en parte más seca, mate y

muy rugosa, de color cinabrio en la parte mate y de color de minio en la parte mucosa. Borde con franja de seudomicelio.

Cultivo sobre porta.—Sobre medio de agar-patata se forma seudomicelio, con abundantes verticilos de blastosporas cilíndricas, poco diferentes de las células del seudomicelio.

Esporulación.—Produce ballestosporas reniformes (fig. 15), algunas de ellas con esterigmas larguísimos. Frecuentemente las esporas secun-

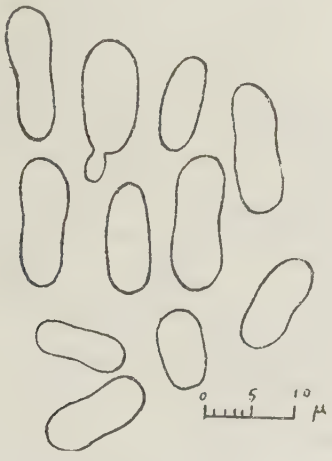


FIG. 14.
Sporobolomyces boleticola, n. sp.
Células en extracto de malta, a los tres días, a 25° C.

darias pueden tener varios esterigmas, pasando a veces de cuatro.

Fermentación.—Negativa.

Asimilación de azúcares:

Glucosa	+	
Galactosa	—	(incluso con el método de Wickerham).
Sacarosa	+	
Maltosa	+	
Lactosa	—	

Asimilación de nitrato potásico.—Negativa.

Asimilación de etanol como fuente de carbono.—Negativa.

Hidrólisis de la arbutina.—Ligeramente positiva.

Procedencia.—Se han aislado dos cepas de esta especie: la IJFM 533, de *Boletus aurantiacus,* y la IJFM 534, de *Boletus luteus.*

Discusión.—Por sus caracteres morfológicos, esta especie está más próxima de *Sporobolomyces gracilis* y de *Sporobolomyces albo-rubescens.* Por sus caracteres fisiológicos se aproxima más al *Sporobolomyces pararoseus.* Pero se diferencia bien de estas especies, por lo que hacemos de ella una nueva especie, para la que proponemos el nombre de *Sporobolomyces boleticola,* n. sp.

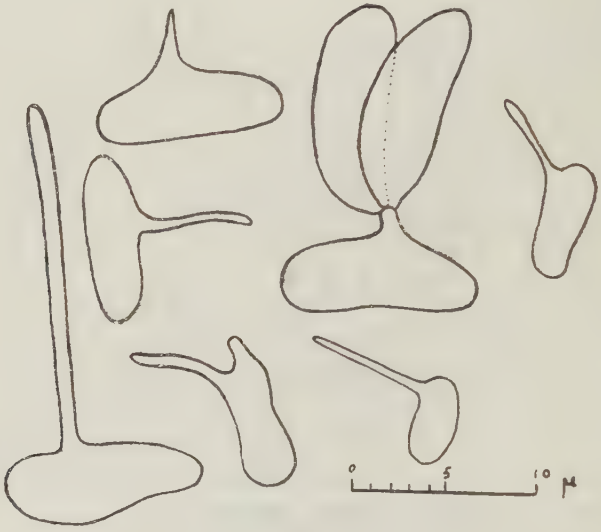


Fig. 15.
Sporobolomyces boleticola, n. sp. Ballestosporas y esporas secundarias en agar malta.

Diagnosis latina.—In musto maltato cellulae cylindridratae (3,5-6). (9-16)µ; anulus et sedimentum formantur (post unum mensem, 17° C.) pellicula formatur.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C.) miniata, mollis, satis muçosa aut surda, crispulata aut plana, margine undulato. Pseudomycelium abundat. Blastosporae ovoideae.

Fermentatio nulla. In medio minerali cum glucoso, saccharo, maltoso crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit. Arbutinum finditur (exigua).

Ballistosporae reniformae formantur.

Clave de especies del género Sporobolomyces Kluyver et van Niel.

1 a. Nitrato potásico asimilado ... ... (2)

b. Nitrato potásico no asimilado ... ... (5)

2 a. Glucosa y galactosa asimiladas; esta última débilmente ... ... *Sp. hispanicus* Peláez y Ramírez.

b. Glucosa y sacarosa asimiladas; galactosa asimilada débilmente o no asimilada ... ... (3)

c. Glucosa, sacarosa y maltosa asimiladas, galactosa asimilada débilmente o no asimilada ... ... (4)

3 a. Con micelio verdadero ... *Sp. salmonicolor* Kluyver et van Niel.

b. Sin micelio verdadero.. ... *Sp. odorus* Derx.

4 a. Con micelio verdadero ... *Sp. holsaticus* Windisch.

b. Sin micelio verdadero.. ... *Sp. roseus* Kluyver et van Niel.

5 a. Además de la glucosa, sólo asimila a veces (débilmente) la galactosa. ... ... *Sp. gracilis* Derx.

b. Glucosa, sacarosa y maltosa asimiladas; con seudomicelio ... ... *Sp. boleticola,* n. sp.

c. Glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa asimiladas; sin seudomicelio ... ... (6)

6 a. Células ovales, pequeñas (3-5) . (6-11) micras ... ... *Sp. pararoseus* Olson et Hammer.

b. Células largo ovales a cilíndricas, grandes (4-7) . (11-20) micras ... ... *Sp. alborubescens* Derx.

RESUMEN

Se han aislado de hongos carnosos en descomposición, 117 especies de levaduras que vivían en dicho «habitat». El autor describe con detalle el material y métodos empleados para ello; relaciona las levaduras aisladas y describe las «n. sp.» encontradas.

SUMMARY

117 species of yeasts were isolated from fungus in descomposition. The autor describes with detail the material and methods employed; he makes acquainted the yeasts isolated and describes the «n. sp.» ones that were found.

BIBLIOGRAFIA

ADRIÁN, E. T., y R. A. CRUZ: The chemical composition of Philipines muschrooms. Phil. J. Agr. 4; 1-11, 1933.

ANDERSON, K. W., and C. E. SKINNER: Yeasts in descomposing fleshy Fungi. Mycologia, 39; 165-170, 1947.

BOIDIN, J., et F. ABADIE: Les Levures des liqueurs tannantes végétales; leur action sur les tanins pyrogalliques. Bull. Soc. Myc. France. LXX; 353-383, 1954.

CLARK, D. S., and R. H. WALLACE: Canad. J. Microb. Vol. I, n.º 4; 275, 1955.

DIETRICHSON, E.: Etude d'une collection norvégienne de Levures. Ann. Parasit. Hum. Comp. XXIX, n.º 4, 272-498, 1954.

GENESTAR SERRA, R.: Contribución al estudio de las levaduras de taninos. Tesis doctoral de Biología de la Universidad de Madrid. 1955.

GENESTAR SERRA, R.: Nueva especie de levadura aislada de concentrado de tanino: Candida majoricensis. Microbiología Española. Vol. 9, n.º 3; 275-279 1956.

HEDRICK and BURKE: Mycopathologia et Mycologia applicata. Vol. 1, fasc. 2; 92. 1951.

HILKENBACH, R.: Disertation. Nektarhefen. Neue Beitrage zur Cenntnis der wilde Hefen in der Natur. Ex Koch Garungsorganismen, 1911.

KUHNER, R., et H. ROMAGNESI: Flore analytique des champignons Supérieurs. Paul Lechevalier. Paris, 1956.

LODDER, J., and N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts. Amsterdam, 1952.

LUND, AAGE: Studies on the ecology of yeasts. Copenhague. 1954.

MILLER, M. W., and E. M. MRAK: Applied Microbiology. Vol. I, n.º 4; 1953.

PELÁEZ CAMPOMANES, F., y C. RAMÍREZ GÓMEZ: El sporobolomyces hispanicus; nueva especie de Sporobolomycetaceae aislado de extracto de corteza de encina. Microb. Española. Vol. 9, n.º 1; 37-44, 1956.

RAMÍREZ GÓMEZ, C.: Estudio sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos. Microb. Esp. Vol. 6, n.º 3; 249-253, 1953.

ROBINOW, C. F. A.: A study of the nuclear apparatus of bacteria. Roy. Soc. London. Proc. B., 130; 299-324, 1942.

SCHESTER et VLADIMIR ULEHLA: Studien uber Nektar organismen. Ber. d. deutch. Bot. Ges., XXXII; 129, 1913.

SCHOELLHORN, K.: Sur la fermentation de quelques levures des néctars des plantes d'hiver. Thèse n.º 636. Genève, 1920.

SHIFRINE, M., and H. J. PHAFF: Mycologia, 48; 47-55, 1956. The association of yeasts with certain bark beetles.

RECCA, E., and MRAK: Food technology. 6 (12); 450-454, 1952.

STARKEY, R. L.: J. Bact. 51; Lipid production by soil yeasts (1946).

STOLTZ, R.: Sprosspilze im Nektar der Bluten. Mikrokosmos, 12; 1911.

VAN UDEN, N.: Zur Kenntnis von Torulopsis pintolopesii. Arch. Mikrob. 17; 199-208, 1952.

VAN UDEN, N.: Und L. do Carmo Sousa. Arc. f. Mikrob. Band. 18; Heft 4; 1953.

VAN UDEN, N.: Und Assis-Lopes, L. Zur kenntnis von Candida Castellanii. Archiv. f. Mikrob. band 18. Heft. 4, 1953.

VAN DER WALT, J. P.: Kluyveromyces. A new yeast Genus of the Endomycetales. Antonie van Leeuwenhoek, 22; 265-272, 1956.

WICKERHAM, J. L. FLICKINGER and BURTON, K. A.: J. Bact. 52; 1946.

YAMASAKI, ISSUE, YUKIO SAMOTURA, TAKEHIKO YAMAMOTO, HISAO FUJII y KENACHI WATANABE: Kyûshu University Fukuoka (Japón. 1952.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

Acta de la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiológicos Españoles el día 15 de junio de 1956.

Bajo la presidencia de don Gerardo Clavero del Campo, y actuando como secretario don Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las veinte horas quince minutos en el aula del edificio central del C. S. I. C., Serrano, 117.

Se aprueba el Acta de la sesión anterior. El secretario da cuenta de una carta del profesor Hauduroy, a la que acompañan los estatutos de la recién creada Sección Europea de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología y las actas de las sesiones celebradas en el pasado mes de mayo, en Dôle, donde fueron aprobados dichos estatutos por los representantes de sociedades europeas. Asimismo, se lee una carta del señor Oliver Suñé, de Barcelona, que, con carácter personal, asistió a dicha Reunión. Intervienen, además del señor Presidente, el Señor Salaya y el secretario, y se acuerda que la Sociedad de Microbiólogos Españoles haga efectiva su adhesión a la nueva entidad y que la Junta Directiva, en su reunión próxima, designe el representante de la Sociedad.

El señor Presidente indica que va a celebrarse el escrutinio de los votos secretos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta, renovación que comprende los cargos de Presidente, Vicepresidente, Secretario y cuatro Vocales. Son designadas las señoritas Beltrá y Cabezas de Herrera para ayudar al acto del escrutinio. Se anula un sobre, sin abrirlo, por falta de remitente, y dos votos, de los 98 recibidos, por no ajustarse a las condiciones de la votación. Votos efectivos: 96. El recuento da los siguientes resultados:

Presidente: don Arnaldo Socías Amorós, 83 votos; don Florencio Bustinza Lachiondo, 1; don Gerardo Clavero del Campo, 5; don Genaro Alas Cores, 1; don Eduardo Gallardo Martínez, 1; don Miguel Benlloch Martínez, 1; don Lorenzo Vilas López, 1; don Valentín Matilla Gó-

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLAS